

Charakterisierung der Interaktion  
zwischen dem tumorassoziierten Protein Np9  
des humanen endogenen Retrovirus HERV-K (HML-2)  
und der humanen Serin-Protease (HumHtrA2)

## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Isabel Brand

Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin

Betreuer: Prof. Dr. T. Rümenapf

und

Institut für Virologie der Universität Homburg

Betreuer: Prof. Dr. N. Müller-Lantzsch

Charakterisierung der Interaktion

zwischen dem tumorassoziierten Protein Np9

des humanen endogenen Retrovirus HERV-K (HML-2)

und der humanen Serin-Protease (HumHtrA2)

## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Isabel Brand**

Tierärztin aus Saarbrücken

Gießen, 2005

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. Rümenapf  
Prof. Dr. Müller-Lantzsch  
Prof. Dr. Lämmle

Disputation: 1. Dezember 2005

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Müller-Lantzsch danke ich recht herzlich für die Betreuung der Doktorarbeit, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und insbesondere für das Entgegenkommen, eine externe veterinärmedizinische Dissertationsarbeit in der Abteilung für Virologie anfertigen zu dürfen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Marlies Sauter bedanken, die mir während der gesamten Arbeit jederzeit mit wertvollen Ratschlägen hilfreich zur Seite gestanden hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Rümenapf recht herzlich für die hilfreiche Unterstützung bei der schriftlichen Abfassung der Dissertationsarbeit.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Frau Barbara Best bedanken, für die tatkräftige Unterstützung im Labor und die zahlreichen nützlichen Tipps und freundlichen Worte.

Eine Erwähnung möchte ich Sandra Kehr, Thorsten Pöhland und Miriam Denne zukommen lassen, durch die mir die letzten Monate als eine besonders „Gute Zeit“ in Erinnerung bleiben werden.

Von Herzen danken möchte ich insbesondere meinen Eltern ,  
die mir immer zur Seite gestanden haben,  
meiner Schwester Vanessa  
und besonders meinem Freund Martin,  
der sich mal wieder als mein bester Freund erwiesen hat.

# I Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Retroviren	1
1.2	Klassifikation der Retroviren	2
1.3	Genomorganisation des infektiösen Partikels und des Provirus	3
1.4	Genprodukte	5
1.5	Zelltransformation und Tumorgenese	7
1.6	Humane endogene Retroviren ( HERV )	9
1.7	Bedeutung humaner endogener Retroviren	10
1.8	Einteilung humaner endogener Retroviren	11
1.9	Das humane endogene Retrovirus K (HERV- K)	13
1.10	Effekte der HERV-Insertion	14
1.10.1	Vorteile retroviraler Insertion für den Wirtsorganismus	14
1.10.2	Nachteile retroviraler Insertion für den Wirtsorganismus	16
1.11	Bedeutung porziner endogener Retoviren (PERV)	16
1.12	Genomaufbau des HERV-K	18
1.13	HERV-K und Tumorassoziation	20
1.14	Genprodukte des HERV-K	22
1.15	Das HERV-K Gen <i>np9</i>	23
1.16	Die humane Serin-Protease HtrA (HumHtrA)	24
1.17	Ziele der Arbeit	27
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>30</b>
2.1	Enzyme und Oligonukleotide	30
2.2	Puffer	30
2.3	Molekulargewichtsmarker	31
2.3.1	DNA-Molekulargewichtsmarker	31
2.3.2	Protein-Molekulargewichtsmarker	31
2.4	Bakterienstämme und Nährmedien	32
2.5	Zelllinien	32
2.6	Nährmedium	32
2.7	Oligonukleotide	33
2.8	Vektoren und Konstrukte	33
2.8.1	Parenterale Vektoren	33
2.8.2	Konstrukte	34
2.9	Reagenzien und "Testkits"	35
2.9.1	„ Kits“ und Transfektionsreagenzien	35
2.9.2	Radiochemikalien	35
2.9.3	Photochemikalien	35
2.10	Mikroskope, Computersoftware und Internetseiten	36

<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>37</b>
3.1	DNA-Techniken	37
3.1.1	Agarose-Gelelektrophorese	37
3.1.2	Aufreinigung der DNA aus Agarosegel	37
3.1.3	Die Polymerase-Ketten- Reaktion (PCR)	38
3.1.4	DNA-Sequenzierung	39
3.1.5	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	39
3.1.6	Phosphatasebehandlung von Vektoren	39
3.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten	40
3.1.8	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	40
3.1.9	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	41
3.1.10	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	41
3.2	Protein-Techniken	42
3.2.1	Herstellung von Proteinextrakten	42
3.2.1.1	Zellaufschluss unter nativen Bedingungen	42
3.2.1.2	Zellaufschluss unter reduzierenden Bedingungen	42
3.2.1.3	Proteinsynthese durch <i>in-vitro</i> Transkription/Translation	43
3.2.2	Techniken zum Nachweis von Proteinen	43
3.2.2.1	SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.2.2.2	Immuno-Blot (Western-Blot)	44
3.2.2.3	Unspezifischer Nachweis von Proteinen im SDS-Gel	45
3.2.2.4	Nachweis radioaktiv-markierter Proteine durch Autoradiographie	45
3.2.3	Techniken zum Nachweis der subzellulären Proteinlokalisierung	46
3.2.3.1	Detektion autofluoreszierender Proteine durch Fluoreszenzmikroskopie	46
3.2.3.2	Anfärben von zellulärer DNA mit dem DAPI-Reagenz	46
3.2.4	Methoden zum Nachweis von Protein-Interaktionen	47
3.2.4.1	GST-Pulldown Analysen	47
3.2.4.2	Kolokalisations-Assay	48
3.3	Zellkultur-Techniken	48
3.3.1	Kultivierung und Lagerung von Bakterien	48
3.3.2	Kultivierung und Lagerung immortalisierter Säugerzelllinien	49
3.4	Transformation von Zellen	49
3.4.1	Transformation von Bakterienzellen	49
3.4.2	Transfektion von Säugerzellen	50
3.4.2.1	Transfektion mit FuGENE-6	50
3.5	Klonierung der HtrA2	50
3.5.1	Amplifikation der Fragmente <i>HtrA2-N</i> , <i>HtrA2-MI</i> und <i>HtrA2-C</i>	50
3.6	Klonierung der HtrA2 in pEGFP-C1 und pDsRed-C1	51
3.6.1	Klonierung der HtrA2frag in pEGFP-C1 und pDsRed-C1	51
3.6.2	Klonierung der HtrA2ges in pEGFP-C1 und pDsRed-C1	52
3.7	Klonierung der HtrA2 in pGEX	53
3.7.1	Klonierung der HtrA2frag in pGEX	53
3.7.2	Klonierung der HtrA2ges in pGEX	54
3.8	Klonierung der HtrA2 in pSG5 bzw.pSG5HA	55

3.8.1	Klonierung der HtrA2frag in pSG5HA	55
3.8.2	Klonierung der HtrA2ges in pSG5	56
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
4.1	Klonierung der HtrA2	57
4.1.1	Amplifikation der Fragmente <i>HtrA2-N</i> , <i>HtrA2-MI</i> und <i>HtrA2-C</i>	57
4.1.2	Ligation der Fragmente in den Vektor pUC18	58
4.2	Zelllokalisations-Assay	59
4.2.1	Transfektion von Cos-1 Zellen durch HtrA2frag	60
4.2.2	Transfektion von Cos-1 Zellen durch HtrA2ges	61
4.2.3	Kotransfektion von Cos-1 Zellen durch die HtrA2ges und Np9	62
4.3	GST- Pulldown	64
4.3.1	<i>In-vitro</i> Translation von HtrA2frag und HtrA2ges	65
4.3.2	GST- Pulldown Analyse	66
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
5.1	Die Klonierung der HtrA2	70
5.2	Das Zelllokalisations-Assay	70
5.3	Die GST-Pulldown-Analyse	73
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>76</b>

# Einleitung

## 1.1 Retroviren

Bis Anfang der siebziger Jahre waren sich die Molekulargenetiker einig, daß infektiöse Partikel in Form eines Retrovirus nicht existieren können. Die Erbinformation - so glaubte man - wird ausschließlich von der DNA zur RNA und weiter zu den Proteinen gegeben; diesen Weg des Informationsflusses bezeichnete man als das " Zentrale Dogma der Molekularbiologie".

H. Termin widerlegte dieses nicht nur durch die Entdeckung des Mechanismus der Reversen Transkription, sondern postulierte außerdem sogenannte „retrovirale Sequenzen“ als einen normalen Bestandteil menschlicher Zellen (Termin, 1974). Anfang der achtziger Jahre wurde mit der Entdeckung von HIV das bislang bedeutenste exogene Retrovirus beschrieben (Barre-Sinoussi et al., 1983). Die Existenz endogener Retroviren wurde von Löwer et al. fast zeitgleich durch die Entdeckung von HTDV-Partikel (human teratocarcinoma-derived virus) in Überständen von Teratokarzinomzelllinien näher charakterisiert und Jahre später wurden diese als HERV-K(HML-2)-kodierte Partikel identifiziert (Löwer et al., 1984; Boller et al., 1993). Retroviren sind heute eine wichtige Familie in der biologisch/medizinischen Forschung. Ihre herausragende Bedeutung verdanken diese nicht nur ihrem einzigartigen Replikationsmechanismus, der die Integration intermediärer Formen in das Genom der Wirtszelle erfordert, sondern außerdem ihrer Assoziation mit zahlreichen klinisch relevanten Krankheitsbildern sowohl in der Human- als auch der Veterinärmedizin (vgl.Tab.1). Die Bedeutung humaner endogener Retroviren (HERV) sowie die potentielle Gefahr endogener Retroviren anderer Spezies für das menschliche Genom insbesondere im Rahmen der heterologen Organspende sind aktuelle Forschungsschwerpunkte mit nicht zu unterschätzender klinischer und wirtschaftlicher Relevanz .



## 1.2 Klassifikation der Retroviren

Ein Überblick über die Klassifikation der Retroviren und Vertreter der einzelnen Subfamilien zeigt Tab. 1.

Tabelle 1: Charakteristische Vertreter der Retroviren (aus Molekulare Virologie; Modrow, Falke und Truyen; 2. Auflage, 2003)

Genus	Mensch	Tier	Typ
$\alpha$ -Retrovirus		Aviäre Leukoseviren (ALV) Rous-Sarkomvirus (RSV) Aviäres Erythroblastosisvirus (AEV) Aviäres Myoblastosisvirus (AEV) Rous- assoziierte Viren (RAV 1-50) Rous- assoziierte Viren (RAV 0)	exogen exogen exogen exogen exogen exogen
$\beta$ - Retrovirus	HERV-K Familie	Maus-Mammatumortumor-Virus (MMTV) Ovines Lungenadenomatosevirus Mason-Pfizer-Affen-Virus (MPMV)	exo/endogen exogen exogen endogen
$\gamma$ - Retrovirus	Erv-3 S71 Familie	Felines Leukämievirus (FeLV) Felines Sarkomvirus Moloney-Mausleukämievirus (MoMLV) Affenleukämievirus (SLV) Gibbonleukämievirus (GALV) Murine Sarkomviren (MSV) Harvey-Maussarkomvirus (HA-MSV) Affen-(Simian-) Sarkomvirus (SSV)	exogen exogen exogen exogen exogen exogen exogen exogen endogen endogen
$\delta$ -Retrovirus	Humane T-Zell-Leukämie-Viren (HTLV-1/HTLV-2) HRES-1	Bovines Leukosevirus (BLV) Simian-Lymphotropic-Virus (STLV)	exogen exogen endogen
$\epsilon$ -Retrovirus		Diverse Fischretroviren Walleye-Dermal-Sarcoma-Virus	exogen exogen
Lentivirus	Humane Immundefizienzviren (HIV-1/HIV-2)	Affenimmundefizienzvirus (SIV) Felines Immundefizienzvirus (FIV) Bovines Immundefizienzvirus (BIV) Maedi-Visna-Virus der Schafe (MVV) Virus der Infektiösen Anämie der Pferde (EIAV) Caprines Arthritis-Enzephalitis-Virus (CAEV)	exogen exogen exogen exogen exogen exogen
Spumavirus		Feline Spumaviren Affenspumaviren Bovine Spumaviren Equine Spumaviren	exogen exogen exogen exogen

Die Familie der Retroviren ist in sieben Genera, namentlich  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\varepsilon$ -Retroviren, sowie Spumaviren und Lentiviren untergliedert. Diese Unterteilung basiert neben genetischen und morphologischen Aspekten auf Besonderheiten der Infektion und der induzierten Krankheitsbilder. Die ersten fünf in Tab. 1 gelisteten Genera können nach ihrem pathogenen Potential zur Gruppe der Onkoviren zusammengefaßt werden, da sie insbesondere als kausale Agenzien in der Tumorgenese diskutiert werden. Spumaviren zeichnen sich charakteristischerweise durch persistierende, klinisch inapparente Infektionen aus. Das Genus der Lentiviren beinhaltet retrovirale Vertreter, deren Infektion sich durch einen anfänglich inapparenten, aber langsam progressivem Krankheitsverlauf mit meist letalem Ende auszeichnet (Fields et al., 1996). Eine weitere Unterteilung der Retroviren bezüglich der Komplexität der Genomstruktur ist möglich. Neben den im retroviralen Lebenszyklus grundsätzlich erforderlichen Proteinen werden von einer Vielzahl an Retroviren sogenannte akzessorische Proteine kodiert, die an funktionellen Schlüsselpositionen die effiziente Virusvermehrung gewährleisten (vgl. Kap. 1.4).

### 1.3 Genomorganisation des infektiösen Partikels und des Provirus

Der Aufbau des retroviralen Genoms eines infektiösen Viruspartikels (Virion) und der ins Wirtsgenom integrierten proviralen Form (Provirus) unterscheiden sich maßgeblich voneinander. Im Virion liegt die genetische Information in Form einer einzelsträngigen, diploiden RNA in “+- Orientierung” vor; mit der 5'-Cap-Struktur und der 3'-Polyadenylierungssequenz besitzt sie alle Charakteristika einer eukaryotischen mRNA. Die Cap-Struktur dient dem Schutz vor einem Abbau durch zelluläre Nukleasen, die Polyadenylierungssequenz ist Voraussetzung zur Nutzung der eukaryotischen Translationsmaschinerie. Die für die *gag*, *pol* und *env*- Genprodukte kodierenden Sequenzen werden von regulatorischen Kontrollelementen flankiert, die neben der Promotorsequenz die Primer-Bindungsstelle (PBS) für transaktivierende zelluläre und virale Proteine beinhalten (vgl. Abb. 1a). Das Genom aller infektiösen Retroviren enthält einen offenen Leserahmen für die

Produkte Gag (gruppenspezifisches Antigen), Pol (enzymatische Aktivitäten) und Env (Glykoproteine) (vgl. Kap.1.4). Die kodierenden Regionen werden am 5'- und 3'-Ende des Genoms von nicht kodierenden, aber regulatorisch wichtigen Kontrollsequenzen flankiert, welche sowohl für die Reverse Transkription als auch die Integration der viralen Erbinformationen in die zelluläre DNA essentiell sind. Nach der Reversen Transkription liegt eine doppelsträngige DNA vor, die in die zelluläre DNA integriert wird; es entsteht das Provirus. Das provirale Genom wird jetzt von den LTRs (long terminal repeats) flankiert, die sich ihrerseits in U3, R und U5 Domänen unterteilen lassen. Diese entsprechen der Anordnung der terminalen Sequenzbereiche nach der Reversen Transkription (vgl. Abb. 1b). Entsprechend einem zellulären Gen erfolgt die Initiation der viralen Transkription durch eine Veränderung der Zusammensetzung der Transkriptionsaktivatoren und –repressoren am LTR (Collingwood et al., 1999). Das Zusammenspiel zellulärer Faktoren am LTR hängt neben der Verfügbarkeit der benötigten Proteine maßgeblich von der Sequenz der LTRs ab. Aufgrund dessen stellen die Bindungsstellen im viralen LTR die zweite virale Determinante der Wirtszellspezifität nach dem Fusionsprozeß an der Wirtszelloberfläche dar (Maury et al., 2000).

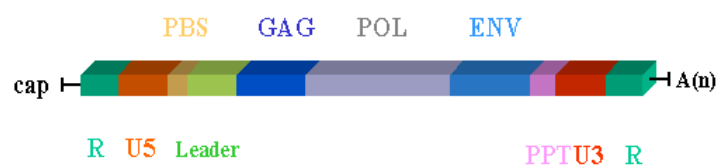


Abbildung 1a: Schema des RNA-Genom des infektiösen Viruspartikels

Genomorganisation der Retroviren; Anordnung der Sequenzelemente und offener Leserahmen; Das Genom ist am 5'-Ende mit einer Cap-Gruppe modifiziert, das 3'-Ende ist polyadenyliert. An die PBS-Region (Primer Binding site) wird eine tRNA gebunden. R: wiederholte (redundant) Regionen; U3 und U5: besondere (unique) Regionen am 3'- bzw. 5'-Ende. Die für Gag, Pol- und Env-Proteine kodierenden Regionen sind durch dunkelschattierte Bereiche angedeutet (nach <http://www.med.sc.edu:85/lecture>)

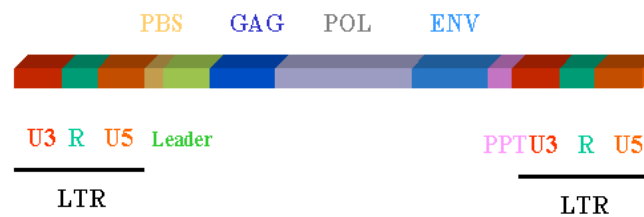


Abbildung 1b: Schema der integrierten Provirus-DNA

Anordnung der Sequenzelemente und offener Leserahmen des Provirus nach Integration in das Wirtszellgenom. LTR (long terminal repeat) kennzeichnet die Anordnung der Sequenzelemente, die im Verlauf der reversen Transkription gebildet werden (nach <http://www.med.sc.edu:85/lecture>)

## 1.4 Genprodukte

Retroviren besitzen für Gag-, Pol- und Env-Proteine kodierende Sequenzen. Die *gag*-Region befindet sich in fast allen Retroviren stromabwärts des 5'-LTR und kodiert für das Matrix- (MA), Kapsid- (CA) und das Nukleokapsidprotein (NC). Die Translation erfolgt in Form eines Gag-Vorläuferproteins, welches durch die viruskodierte Protease in die funktionellen Einzelkomponenten gespleißt wird. Diese Autoprozeßierung erfolgt in unmittelbarem Zusammenhang mit der als "budding" bezeichneten Abknospung des Virions an der Zelloberfläche (Kräusslich und Welker, 1996). Durch Anlagerung des MA-Proteins mittels einer aminoterminal lokalisierten Myristylsäure-Modifikation an die Innenseite der Wirtszellmembran wird die retrovirale Partikelbildung eingeleitet (Yu et al., 1992). Das CA-Protein umgibt den über ein Zinkfinger-Motiv gebildeten NC-RNA-Komplex, der im reifen Virion von der MA-Hülle umgeben ist (Sakalian und Hunter, 1998). Komplexe Retroviren, zu denen Lentiviren, Spumaviren und einige Vertreter der Onkoviren gerechnet werden, besitzen zusätzlich eine Vielzahl kleiner, offener Leserahmen zur Synthese akzessorischer Proteine mit bislang noch nicht eindeutig geklärter Funktion (Löwer et al., 1995). Diese besitzen teilweise eine solch essentielle Bedeutung, daß im Falle ihrer genetischen oder funktionellen Defizienz die Infektiosität des Virus verloren gehen kann. Beispiele finden sich

unter anderem bei HIV (p6), RSV (p23) oder bei MLV (p12) (Vogt in Coffin et al., 1997).

Der *pol*- Leserahmen, dessen weitere Untergliederung in *prt* und *pol* möglich ist und stromab des *gag*-Gen lokalisiert ist, kodiert für die retroviralen Enzyme; hierzu gehören die Protease (*prt*-kodiert), die Reverse Transkriptase und die Integrase (beide *pol*-kodiert). Die Protease spaltet das Gag-Vorläuferprotein in die funktionellen Einzelkomponenten. Bei HIV findet sich ein durchgehend offener Leserahmen für die Bereiche *prt* und *pol*, wodurch ein gemeinsames Vorläuferprotein translatiert wird, aus welchem sich die Protease autokatalytisch freisetzt (Vogt in Coffin et al., 1997). Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die RNA in DNA umzuschreiben in der Lage ist. Mit Hilfe der RNase H-Aktivität baut diese spezifisch RNA in RNA-DNA-Hybriden ab; ihr fehlt jedoch eine „proofreading“-Funktion zur Überprüfung der Lesegenauigkeit. Die Integrase dient der Integration des revers transkribierten Virusgenoms in die DNA der Wirtszelle. Zunächst schneidet diese die zelluläre Doppelstrang-DNA, um anschließend die proviralen Enden in die entstandene Schnittstelle zu ligieren (Levy, 1994). Aufgrund der Tatsache, daß die Protease bei der Reifung des infektiösen Partikels und die Proteine des *pol*- Bereichs nach Infektion der Zelle unmittelbar zur Integration in das Wirtszellgenom essentiell sind, werden diese als enzymatische Grundausrüstung in das Virion eingelagert. Dies betrifft auch einige der akzessorischen Proteine (Karczewski und Strebel, 1996; Welker et al., 1996; Fackler et al., 1996).

Von dem *env*- Leserahmen, der sich am 3'-Ende des viralen Genoms befindet, werden zwei Glykoproteine in Form eines Env-Vorläuferproteins translatiert, welche durch einfaches Spleißen aus der RNA hervorgehen. Das Vorläuferprotein wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) um das Signalpeptid gekürzt, im Golgi-Apparat posttranslational modifiziert und durch zelluläre Proteasen in die beiden funktionellen Untereinheiten SU (surface) und TM (transmembrane) gespalten. Das größere SU-Protein befindet sich ausschließlich außerhalb der Wirtszellmembran und ist für die Rezeptorbindung verantwortlich, das kleinere TM-Protein verankert den SU-Anteil in der Zellmembran. Bei HIV wurde kürzlich eine Konformationsänderung der TM-Domäne für eine effiziente Bindung der SU-

Domäne an den CD4-Rezeptor verantwortlich gemacht (Hildinger et al., 2001). Im Falle einer retroviralen Infektion werden neutralisierende Antikörper gegen die Epitope beider Membranproteine gebildet. (Molekulare Virologie; Modrow, Falke und Truyen, 2. Auflage, 2003).

## **1.5 Zelltransformation und Tumorgenese**

Schon früh erkannte man, daß Viren in der Lage sind, tumoröse Erkrankungen hervorzurufen. Bereits 1911 postulierte Peyton Rous, daß Viren beim Geflügel maligne Tumoren verursachen können. DNA-Viren, wie das tierpathogene SV40 (simian virus 40) führen teilweise wirtsabhängig zu einer Lyse ihrer Wirtszelle (Rajevskaya et al., 1989). In jenen Zellen, in denen kein lytisches Wachstum erfolgt, wird ein Teil oder das gesamte virale DNA-Genom in das Wirtsgenom integriert, was zur malignen Entartung der Zelle führen kann. Ursächlich werden in diesem Zusammenhang virale Proteine verantwortlich gemacht (z.B. das T-Antigen bei SV40), welche an die Tumorsuppressoren Rb und p53 der Wirtszelle binden und diese inaktivieren (Guenal et al., 1995). Die Inaktivierung dieser Tumorsuppressoren führt zum Verlust der Zellzykluskontrolle und damit zu einem unkontrollierten Zellwachstum. Die meisten Viren, die mit Tumorerkrankungen des Menschen korreliert sind, besitzen ein DNA-Genom. Man schätzt, daß etwa 15- bis 20 Prozent aller humanen Krebserkrankungen ätiologisch mit Virusinfektionen assoziiert sind. Klinisch relevante humanpathogene DNA-Tumoviren sind sowohl Vertreter aus der Familie der Papillomaviren, die neben malignen Hauttumoren auch Karzinome in der Genitalschleimhaut verursachen können (Kirwan et al., 2002), als auch das Hepatitis-B-Virus, welches als Mitverursacher des Leberkarzinoms gilt (Chen et al., 2004). Das Epstein-Barr-Virus, ein Vertreter der Herpes-Viren wird in direktem kausalen Zusammenhang zum Burkitt-Lymphom und der Hodgkin's disease beschrieben (Hammerschmidt et Sugden, 2004).

Neben den DNA-Viren wurde auch eine Vielzahl an Retroviren aus verschiedenen Spezies, hauptsächlich Mäusen, Vögeln, Katzen und auch dem Menschen isoliert und in ursächlichem Zusammenhang mit der Tumorgenese diskutiert. Im Falle der akut transformierenden Retroviren fand man heraus,

daß manche dieser Viren in Folge seltener Rekombinationsereignisse zelluläre Gene (Proto-Onkogene) anstelle eines oder mehrerer viraler Strukturgene in ihr Genom aufgenommen hatten. Diese integrierten Proto-Onkogene, die eine essentielle Bedeutung bei der Regulation des Zellzyklus besitzen, werden jetzt als Bestandteil des viralen Genoms mit diesem in das Wirtsgenom der Zielzelle übertragen. Daraus kann eine abnormale Expression dieser Onkogene resultieren, die nicht mehr zell- und entwicklungsspezifisch reguliert werden, sondern durch die starken Enhancer- Elemente des Virus in den infizierten Zellen jederzeit exprimiert werden und somit zur Tumorgenese beitragen können. Viele dieser onkogentragenden Viren sind defekt und benötigen deshalb zur Replikation ein sogenanntes Helfervirus. Das Virus MH2, welches in Hühnern die Bildung von Leukämien und Myelozytomen begünstigt, trägt das zelluläre *myc* –Gen (*c-myc*) als virales Onkogen (*v-myc*) und nutzt das *avian leucosis virus* (ALV) als Helfervirus (Rosenberg und Joliceur in Coffin et al., 1997).

Nicht alle in die Tumorgenese involvierten Retroviren sind onkogentragend. Der Mechanismus über den diese nicht-onkogentragenden Viren in die Tumorgenese involviert sein können, basiert auf deren zufälliger Integration direkt in ein oder in unmittelbare Nähe eines zellulären Gens, das an der Wachstumskontrolle beteiligt ist (Protoonkogen oder Tumorsuppressorgen). Handelt es sich bei diesem Genlocus um das Tumorsuppressorgen, so führt der Verlust dieses Genproduktes durch die Integration viralen Genoms zur Wachstumsenthemmung und damit zur Tumorentwicklung. Erfolgt der Einbau viralen Genoms unmittelbar vor einem Onkogen, so kann eine Überexpression oder zeitlich fehlerhafte Determination der Genexpression zur Tumorgenese führen (Molekulare Virologie; Modrow, Falke und Truyen, 2. Auflage, 2003). Humanpathogene Bedeutung besitzt in der Tumorgenese der RNA-Viren insbesondere die Infektionen mit dem Humanen T-Zell Leukämie Virus (HTLV), welches eine lympho-proliferative Entartung CD4-tragender T-Lymphocyten auszulösen vermag (Sieburg et al., 2004). Stellvertretend für die veterinärmedizinische Bedeutung sei die Enzootische Form der Rinderleukose erwähnt, eine durch das Bovine Leukosevirus verursachte Tumorerkrankung des leukopoetischen Systems, welche zur Entstehung von B-Zell-Lymphomen führen kann (vgl. Abb.2).

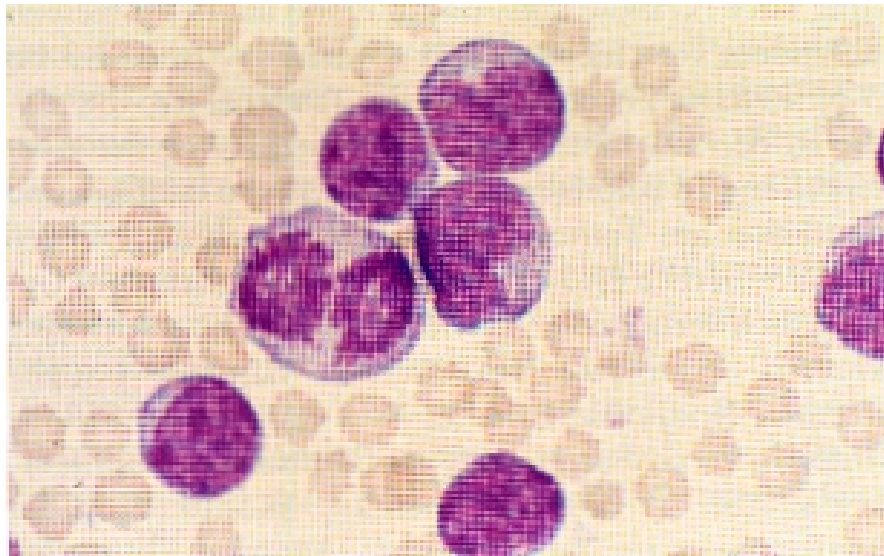


Abbildung 2: Blutausstrich einer an tumoröser Enzootischer Leukose mit Beteiligung der Milz erkrankten Kuh: Zahlreiche unreife und teilweise in Mitose begriffene lymphatische Zellen (leukämisches Blutbild; May-Grünwald/Giemsa-Färbung; 100fache Vergrößerung, aus Innere Medizin und Chirurgie des Rindes; Dirksen, Gründer, Stöber; 4. Auflage).

## 1.6 Humane endogene Retroviren (HERV)

Exogene Retroviren besitzen in ihrem Genom alle Informationen, die für den Ablauf eines vollständigen Infektionszyklus mit Freisetzung infektiöser Partikel benötigt werden. Somit können sich diese Viren von Organismus zu Organismus verbreiten. Im Unterschied dazu sind endogene Retroviren in allen Zellen eines Organismus in das Genom integriert und werden vertikal über Keimbahnzellen übertragen. Während der Evolution ist es diesen ehemals exogenen Viren offenbar gelungen, die Keimbahn und dort die teilungsfähigen Stammzellen von Oozyten bzw. Spermatozyten zu infizieren und sich dauerhaft darin zu etablieren. Endogene Retroviren (ERV) sind somit stabil im menschlichen Genom integriert und werden infolgedessen entsprechend den Mendelschen Regeln vererbt. Prozentual machen sie bis zu 8% des menschlichen Genoms aus (International Human Genome



Sequencing Consortium, 2001). Nachweislich haben sich die humanen endogenen Retroviren vor über 25 Millionen Jahren in die Keimbahn integriert und damit noch vor Evolution des heutigen Menschen (Boeke et al., 1997; Barbulescu et al., 1999). Untersuchungen über die Verteilung retroviraler Elemente im menschlichen Genom zeigten eine besonders hohe Verteilungsdichte auf den Chromosomen 4, 20 und den beiden Geschlechtschromosomen X und Y (Kim et al., 2004). Retrovirale Elemente wurden von derselben Arbeitsgruppe insbesondere in Gewebe von Plazenta, Skelettmuskel, Hypothalamus und Testisgewebe nachgewiesen (Kim et al., 2004).

### **1.7 Bedeutung humaner endogener Retroviren**

Humane endogene Retroviren stellen ein riesiges Reservoir potentiell pathogener viraler Gene und regulatorischer Sequenzen dar, welche entweder spontan oder durch externe Faktoren (z.B. UV-Licht) aktiviert werden können (Hohenadl, 1999). Wie Abb. 3 verdeutlicht, können aktivierte HERVs die zelluläre Genexpression insbesondere in Form der Transaktivierung durch Insertion Promotor- oder Enhancersequenzen enthaltender retroviraler LTRs beeinflussen (vgl. Kap.1.10.1). Die Integration retroviraler Sequenzen kann neben dem Verlust genetischen Materials der Wirtszelle (Deletion), auch zur Entstehung neuer funktioneller Gene führen (Insertionsmutagenese). HERV-kodierte Proteine werden für Dysregulationen des Immunsystems verantwortlich gemacht und insbesondere bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen diskutiert, indem sie als Superantigene wirken oder sogenannte Selbsterkennungsproteine der Zelle maskieren (Molekulares Mimikry), (vgl. Kap.1.10.2). Die Bedeutung humaner endogener Retroviren in der Tumorgenese wird in Kap.1.13 näher erläutert. Nachfolgende Abbildung verdeutlicht schematisch die unterschiedlichen Mechanismen der Einflußnahme durch HERVs auf zellulärer Ebene.

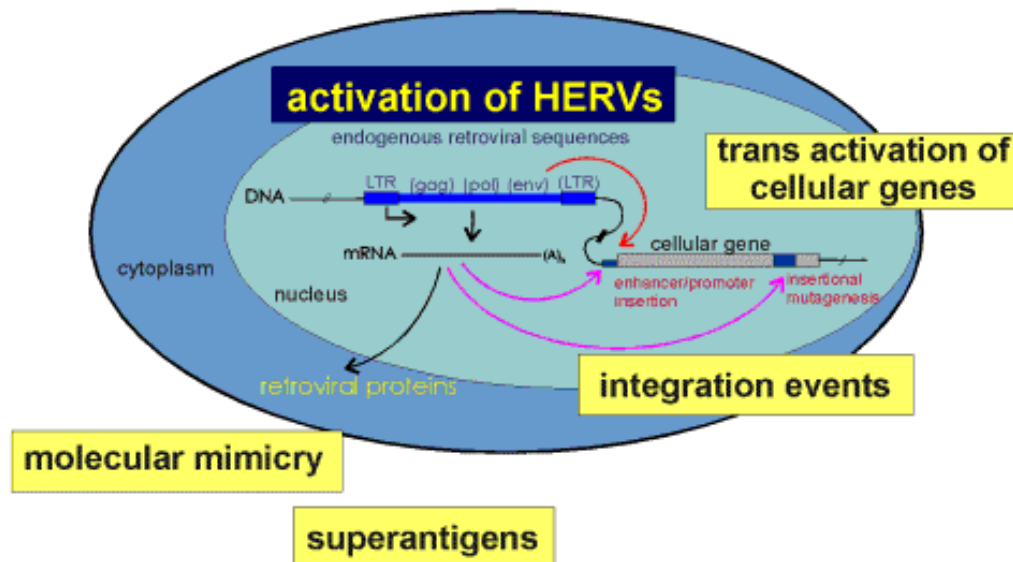


Abb. 3: Schematische Darstellung der Mechanismen zur Einflußnahme humaner endogener Retroviren (HERVs) auf zellulärer Ebene. Dargestellt sind die Möglichkeiten der Transaktivierung zellulärer Gene durch Insertion Enhancer- bzw. Promotor- enthaltender LTR's, die Integration retroviraler Elemente (Insertionsmutagenese), sowie die Synthese retroviraler Proteine, die als Superantigene auf der Zelloberfläche wirken bzw. an der Maskierung der Selbsterkennungsproteine der Zelle beteiligt sein können (Molekulares Mimikry), (nach [http://www.gsf.de/imv/endo\\_rv/results.html](http://www.gsf.de/imv/endo_rv/results.html)).

## 1.8 Einteilung humaner endogener Retroviren

Die Klassifikation humaner endogener Retroviren ist auf verschiedene Arten möglich. Auf Basis der Sequenzhomologie des *pol*-Gens ist eine Einteilung in C-Typ bzw. B-Typ verwandte HERVs möglich (Callahan et al., 1985). Ein anderes Kriterium zur Einteilung humaner endogener Retroviren stellt die tRNA assoziierte Aminosäure dar, welche als Primer bei der Initiation der Reversen Transkription dient. Zur Nomenklatur wird das entsprechende Kürzel des Einbuchstaben-Kodes für Aminosäuren der Abkürzung HERV hinzugefügt (Jurka et al., 2000). Beispielsweise verwendet HERV-K die tRNA-gekoppelte

Aminosäure Lysin (K) zur Initiation der Transkription. Durch diese Nomenklatur werden jedoch Familien mit teilweise sehr unterschiedlichen Homologien zusammengefasst, dem durch die neue Einteilung in Klasse I-III begegnet wird. Vertreter der Klasse I zeichnen sich durch ihre Homologie zu den C-Typ Retroviren aus, die heute zur Familie der Gammaretroviren gezählt werden (vgl. Kap. 1.2). Vertreter der Klasse II zeigen Sequenzhomologien zu den B-Typ Retroviren oder den Betaretroviren. Da die HERV-Ks im *pol*-Bereich hohe Homologie zum MMTV aufzeigen, werden sie um den Terminus HML (*human MMTV-like*) ergänzt und - auf Sequenzhomologien im RT-Bereich basierend - von HML-1 bis HML-6 numeriert. Diese 6 Subfamilien wurden im Jahre 1999 von Andersson et al. um vier neue Vertreter erweitert. Die Vertreter von HML-2 und HML-3 bilden mit etwa 90% den größten Anteil (Callahan et al., 1982; Medstrand und Blomberg, 1993). Die Klasse III stellt eine relativ heterogen zusammengesetzte Klasse dar, die jedoch schwache Homologie zu den Spumaviren aufweist. Nachfolgende Tabelle stellt eine Übersicht der bedeutendsten HERV-Familien dar, teilweise mit synonym verwendeten Bezeichnungen (modifiziert, nach Mager und Medstrand, 2003). Die in Tab. 2 in Klammern angegebene Zahl bezieht sich auf die Anzahl solitärer LTR's im humanen Genom.

Tabelle 2 Wichtigste Vertreter der humanen endogenen Retroviren  
(Nach Mager und Medstrand, Encyclopedia of the human  
Genome, 2003; modifiziert).

Übliche Bezeichnung	Weitere Namen	Kopien/ haploidem Genom
<b>Klasse I HERV's</b>		
HERV-I	RTLVI	250 (1000)
HERV-E		250 (1000)
HERV-R	ERV-3	100 (125)
HERV-W	MSRV	40 (1100)
HERV-9	ERV-9	300 (5000)
HERV-H	RTLVI-H, RGH	1000 (1000)
<b>Klasse II HERV's</b>		
HML-1	NMWH6	70 (350)
HERV-K(HML-2)	HERV-K, HERV-K10	60 (2500)
HML-3	NMWH5	150 (700)
HML-4	HERV-K(T47D)	10 (800)
HML-5	NMWH2	100 (600)

HERV-K(HML-6)	NMWW4	50 (400)
HML-7	NMWW7	20 (140)
HML-8	NMWW3	60 (600)
HML-9	NMWW9	10 (40)
HERV-K(C4)	HML-10	10 (100)
<b>Klasse III HERV's</b>		
HERV-L		200 (6000)
HERV-S		50 (150)

### 1.9 Das humane endogene Retrovirus K (HERV- K)

Mitglieder der HERV-K-Familie sind unter den HERVs die einzigen bekannten endogenen Retroviren mit intaktem, offenem Leserahmen für die Gene *gag*, *pol* und *env* und dadurch prinzipiell zur Synthese aller für die Replikation notwendigen Proteine befähigt (Barbulescu et al., 2001). Bislang konnten jedoch noch keine infektiösen Partikel nachgewiesen werden (Tönjes et al., 1999). Der letzte bekannte Eintritt in das humane Genom dürfte nach Abschluß der Entwicklung des heutigen Menschen erfolgt sein. Die jüngsten und intaktesten Proviren HERV-K113 und HERV-K115 sind vor etwa zweihundert- bis vierhunderttausend Jahren in das menschliche Genom integriert. HERV-K113 mit komplettem offenen Leserahmen für alle retroviralen Gene einschließlich einer intakten Reversen Transkriptase stellt das "vollkommenste" derzeit bekannte endogene Retrovirus dar (Turner et al., 2001). Die bisher am besten untersuchte HERV-Familie ist HERV-K(HML-2). Die Lokalisation eines Provirus wurde von Mayer et al. für das Chromosom 7 beschrieben (1999). HERV-K(HML-2) besitzt offene Leserahmen für *gag*, *pol* und *env* und zeigt nur in einer für die Aktivität der Reversen Transkriptase essentiellen Aminosäuresequenz Mutationen, weshalb dieses Enzym nicht aktiv ist (Mayer et al., 1999). In den HTDVs (human teratocarcinoma-derived virus) konnte jedoch eine Reverse Transkriptase- (RT) und Polymeraseaktivität nachgewiesen werden (Tönjes et al., 1996). Aufgrund dieser Tatsache wird diskutiert, ob andere HERVs mit intaktem Leserahmen für RT sich gegenseitig bei der Bildung von Partikeln ergänzen können (Tönjes et al., 1999). HERV-K Gag wird als Vorläuferprotein exprimiert und

von der sich autokatalytisch freisetzenden Protease prozessiert (Götzinger et al., 1996; Müller-Lantzsch et al., 1993; Schommer et al., 1996). Weiterhin wurde eine spezifische Endonuklease/Integrase Aktivität der viralen Polymerase von Kitamaru et al. (1996) gezeigt. Tönjes gelang es, das Env-Protein eukaryot als glykosyliertes Protein von 80-90 kDa zu exprimieren, jedoch konnte weder eine Prozessierung in OM- (outer membrane) und TM- (transmembrane) Bereiche noch ein Transport an die Zelloberfläche beobachtet werden. Möglicherweise stellt dies den Grund für die fehlende Infektiosität der HTDVs dar.

In HERV-K exprimierenden Zellen werden komplexe Expressionsmuster aus ungespleißten sowie einfach und mehrfach gespleißten HERV-K Transkripten beschrieben, wie man sie auch für die komplexen exogenen Retroviren findet (Löwer et al., 1993). Wenig ist bislang über die exakte Regulation der HERV-K LTRs bekannt. Von Knößl et al. (1999) wurde eine aktivierende Wirkung durch die Bindung des Transkriptionsfaktors YY1 an die Nukleotide 62-83 der HERV-K LTRs beschrieben. Beschrieben wird auch eine Bindung dreier, nicht näher charakterisierter HERV-K LTR-bindender Proteine: Erf-1, Erf-2 und Erf-3 (Akopov et al., 1998).

## **1.10 Effekte der HERV- Insertion**

### **1.10.1 Vorteile retroviraler Insertion für den Wirtsorganismus**

Die meisten endogenen Retroviren sind aufgrund zahlreicher Mutationsereignisse replikationsinkompetent und defekt; oft sind nur die das Provirusgenom flankierenden LTR-Regionen enthalten (Löwer et al., 1996). Jedoch wird das Vorkommen von HERV-Genloci für veränderte zelluläre Genexpressionen verantwortlich gemacht (Brosius, 1999). Insbesondere wird die Anwesenheit von Enhancer und Hormon-responsiblen Elementen in LTR-Strukturen der HERV's für eine modifizierte Regulation der Transkription flankierender zellulärer Gene verantwortlich gemacht. In einer funktionellen Analyse der HERV-K LTR's, die teilweise in tausendfacher Kopienzahl im menschlichen Genom vorliegen, wird die Möglichkeit einer potentiellen

Einflußnahme der LTR's auf die Expression nahegelegener Gene durch Bindung an spezifische zelluläre Nukleoproteine beschrieben (Akopov et al., 1998). HERV-E LTR's aktivieren spezifisch die Amylaseproduktion in der Speicheldrüse, HERV-K LTR's regulieren die gewebsspezifische Expression eines Gens der Insulinfamilie INSL4 - um nur wenige Beispiele zu nennen (Ting et al., 1992; Bieche et al., 2003). Diese Tatsache verdeutlicht, daß nicht nur kodierende Gensequenzen, sondern insbesondere nicht-kodierende Bereiche, wie sie die LTR's darstellen, in der Lage sind, Einfluß auf die Regulationmechanismen der Zelle zu nehmen. Aufgrund der Tatsache, daß die meisten HERVs nicht nur replikationsdefekt sind, sondern eine Infektiosität bislang nicht nachgewiesen werden konnte, ist mit genomischen Konsequenzen einer *de novo* Insertion oder einem Verlust genetischer Information durch Deletion kaum zu rechnen.

Einige Vertreter verschiedener HERV- Familien besitzen außerdem die Fähigkeit zu viraler Proteinsynthese. HERV's, wie beispielsweise HERV-H, HERV-W und HERV-R (ERV3) besitzen einen offenen Leserahmen für das *env*-Gen (Blond et al., 1999; Cohen et al., 1985; Lindeskog et al., 1999). Die Konservierung funktioneller, viraler Sequenzen während der Evolution läßt Vorteile für den Wirt erwarten, wie beispielsweise die Befähigung zur Ausübung physiologisch wichtiger Funktionen oder aber dem Schutz vor Infektion mit exogenen Retroviren. Syncytin ist ein Env-Protein von HERV-W, welches in der Plazenta exprimiert wird und dort die Fusion von Cytotrophoblasten zu Syncytiotrophoblasten *in-vivo* vermittelt. Aufgrund dessen wurde dem Syncytin eine essentielle Bedeutung in der humanen Plazentamorphogenese zugesprochen (Blond et al., 2000; Mi et al., 2000). Fusionsfördernde Eigenschaften in der Entstehung der Trophoblastenschicht der Plazenta wurde auch einem *env*-kodierten Protein des als ERV-3 bezeichneten Provirus der HERV-R-Familie zugeschrieben. Die biologische Relevanz der ERV-3 Insertion wird jedoch durch den Nachweis von Individuen mit einer homozygoten Mutation in dem entsprechenden Genbereich wieder in Frage gestellt (de Parseval und Heidmann, 1998). Aus dem Mausmodell ist bekannt, dass das Fv1 Genprodukt, ein Gag verwandtes Protein eines endogenen murinen Retrovirus-L (MuERV-L) Mäuse vor einer Infektion mit exogenen Friend Virus Leukämie schützt (Goff, 1996). Wie groß die

Bedeutung retroviraler Insertion für die Funktionalität im menschlichen Organismus im einzelnen ist , ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

#### 1.10.2 Nachteile retroviraler Insertion für den Wirtsorganismus

Das Vorkommen von ERV- Sequenzen und die Expression viraler Proteine kann für die Wirtszelle auch Nachteile bergen. In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde dem Syncytin eine (im Vergleich zu Kap.1.10.1) völlig andere Funktion im Zusammenhang mit Multipler Sklerose zugeschrieben. Antony et al. (2004) zeigte, daß Syncytin in den Astrozyten exprimiert und dadurch eine Demyelinisierung von Oligodendrozyten mit nachfolgender Zellnekrose induziert wird. Kontrovers diskutiert wird in diesem Zusammenhang auch die ätiologische Bedeutung humaner endogener Retroviren bei weiteren Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise Schizophrenie (Karlsson et al., 2001), Rheumatischer Arthritis (Gaudin et al., 2000), Typ-I Diabetes (Conrad et al., 1997) und Systemischer Lupus Erythematosus (Talal et al., 1992). Verschiedene HERV-Vertreter werden in der Haut UV-induziert exprimiert und UV-Licht stellt ein auslösendes Agens in der Pathogenese des Lupus dar (Bengtsson et al., 1996; Hishikawa et al., 1997). Nachweislich sind Vertreter aus der HERV-K und HERV-W Familie in der Lage, für Superantigene zu kodieren und sind damit potentiell befähigt, ursächlich an der Entstehung abnormer Immunreaktionen beteiligt sein zu können (Conrad et al., 1997; Perron et al., 2001). Die Expression eines Superantigens des *env*-Gens von HERV-K18 kann durch  $\text{INF-}\alpha$  und damit durch eine virale Infektion wie mit dem Epstein-Barr Virus ausgelöst werden (Stauffer et al., 2001; Sutkowski et al., 2001). Die Assoziation der HERV-K Expression und der Tumorgenese wird in Kap.1.12 beschrieben.

### 1.11 Bedeutung porziner endogener Retoviren (PERV)

Neben umfangreichen Untersuchungen zur Existenz von ERVs bei Hühnern und Mäusen, wird ihr Vorkommen auch bei zahlreichen anderen Tierarten beschrieben, unter anderem auch beim Schwein (PERV) (York und Querat,

2003). Phylogenetisch wird eine Verwandtschaft porziner ERVs zur Klasse der C-Typ Retroviren beschrieben (Li et al., 2004). Im Rahmen der Xenotransplantation, welche insbesondere Schweine als heterologe Organspender favorisiert, stellt sich die Frage nach einer Übertragung endogener Retroviren vom Schwein auf den Menschen. Eine potentielle Gefahr wird dabei in der Genese von Tumoren oder Erkrankungen des Immunsystems durch PERVs -analog den humanen ERVs- diskutiert.

*In-vitro* Versuche zeigten, daß eine Übertragung und Vermehrung von PERVs in menschlichen Zellen möglich ist. Untersuchungen von Tönjes et al. (1997) ergaben, daß PERVs sich nach Infektion in menschlichen Nierenzellen vermehren können. *In-vitro* Infektionsstudien von Patience et al. (1997) mit zwei porzinen Nierenzelllinien führten zu konträren Ergebnissen. Während der Überstand der MPK- (miniature pig kidney) Zelllinie ausschließlich eine Infektiosität für porcine Zellen besitzt, konnte aus dem Überstand der PK-15 (porcine kidney) Zelllinie zusätzlich eine Infektiosität für humane Zellen nachgewiesen werden. Basierend auf Sequenzhomologien des *env*-Gen, wurde das humanotrope PERV aus der PK-15 Nierenzelllinie in PERV-A und PERV-B unterschieden (Le Tissier et al., 1997). Darüber hinaus wurde eine Freisetzung von PERVs nicht nur aus porcinen Zelllinien, sondern auch aus primär porcinen Zellen, wie z.B. Endothelzellen der Aorta mit teilweise nachweisbarer Infektiosität für humane Zelllinien bestätigt (Martin et al., 1998).

*In-vivo* konnte bislang weder in Infektionsversuchen mit Kleintieren und Primaten, noch in Xenotransplantationsexperimenten eine Übertragung von PERVs auf humane Zellen beobachtet werden. Weder *in-vivo* noch *in-vitro* konnte beispielsweise eine Übertragung von PERVs aus porcinem fetalen Neuronen auf menschliches neuronales Gewebe nachgewiesen werden (Dinsmore et al., 2000). Aufgrund dessen wird eine *in-vivo* Infektiosität porziner ERVs für den Menschen teilweise stark in Frage gestellt (Wilson et al., 1998; Nyberg et al., 2000). Van der Laan (2000) gelang jedoch der Nachweis einer speziesübergreifenden Übertragung porziner ERV-Sequenzen auf murine Zellen von SCID-Mäusen (severe combined immunodeficiency mice) *in-vivo*. Die Möglichkeit, daß HERVs mit ERVs anderer Spezies Chimären mit neuem und möglicherweise pathogenem Phänotyp bilden können, ist aus diesem Grund nicht auszuschließen.



Neben der Züchtung sogenannter “knock-out“ Mäuse ohne endogene, retrovirale Elemente ist die sogenannte RNA-Interferenz eine attraktive Möglichkeit, die potentielle Gefahr durch porcine retrovirale Sequenzen im Rahmen der Xenotransplantation zu unterbinden. Durch den Einsatz einer sequenzspezifischen “small interfering“ (si)-RNA könnte die Boten-RNA selektiv zerstört und eine Freisetzung viraler Partikel verhindert werden. Alternativen bestehen zusätzlich in der gegenwärtigen Entwicklung eines gegen das transmembrane Hüllprotein p15E gerichteten Impfstoffes (Medizin; Xenotransplantation: Schweininieren als Lebensretter, Govi Verlag; 2004).

### 1.12 Genomaufbau des HERV- K

Die Einteilung des HERV-K Genoms erfolgt nach dem Provirusgenom in zwei unterschiedliche Typen. Diese unterscheiden sich durch eine Deletion von 292 Nukleotiden an der Grenze zwischen dem Leserahmen für *pol* und *env* (Löwer et al., 1993). Die unter der Bezeichnung HERV-K10 veröffentlichte Sequenz trägt eine Deletion, die zur Fusion des *pol*- und *env*-Gens führt. Die aus einem Klon, der zusätzliche 290 Nukleotide enthält, und dem Genom des HERV-K10 zusammengesetzte Sequenz wird als HERV-K10(+) bezeichnet (Ono et al., 1986). In diesem zum erstenmal veröffentlichten proviralen Genom enthält das putative *env*-Gen ein Stopcodon. Bis zum heutigen Zeitpunkt hat man auf den menschlichen Chromosomen 30-50 Kopien (pro haploidem Genom) retroviraler Elemente gefunden, die dieser ursprünglich von Ono et al. veröffentlichten HERV-K10 Sequenz ähneln (Meese et al., 1996). Löwer et al. konnte 1993 hingegen einen vollständig offenen Leserahmen für das Hüllprotein beschreiben. Dieser unterscheidet sich von HERV-K10(+) durch die Insertion zweier Nukleotide innerhalb der 290bp-Insertion. Diese resultieren in einem Stopcodon für das *pol*-Gen und in einem offenen Leserahmen für das *env*-Gen. Proviren mit diesen 292 Nukleotiden werden als Typ2 bezeichnet. Die HERV-K(HML-2) Subfamilie umfasst bislang 10 Vertreter des Typ 1 und 11 Vertreter des Typ 2 Provirus (Barbulescu et al., 1999; Costas, 2001; Sugimoto et al., 2000; Turner et al., 2001). Stellvertretend ist in nachfolgender Abbildung jeweils ein repräsentativer Vertreter des Typ 1

(HERV-K 101) und des Typ 2 (HERV-K(HML-2.HOM)) Provirus schematisch dargestellt.

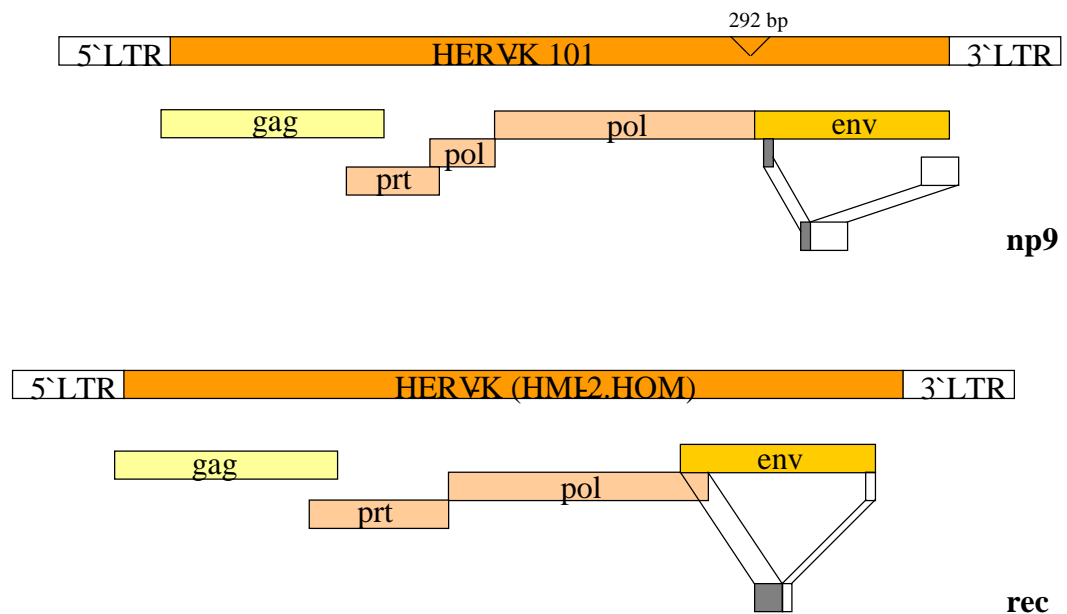


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Provirus HERV-K 101 (Typ 1) und HERV-K (HML-2.HOM) (Typ 2) einschließlich offener Leserahmen aller bislang charakterisierten Gene. Die unterschiedlichen Farben verdeutlichen unterschiedliche Gene, die unterschiedlichen Stufen signalisieren unterschiedliche Leseraster der Gene *gag*, *prt*, *pol* und *env*. *np9* und *rec* gehen durch alternatives Spleißen aus dem *env*- Leserahmen hervor.

Die Abbildung zeigt beide Proviren mit allen nach Barbulescu et al. (1999), Mayer et al. (1999) und Armbrüster et al. (2004) abgeleiteten offenen Leserahmen aller bislang charakterisierten Gene. *np9* und *rec* gehen dabei durch alternatives Spleißen aus dem *env*- Leserahmen von HERV-K101 bzw. HERV-K(HML-2.HOM) hervor und werden durch zwei Exons kodiert, die in unterschiedlichen Leserastern translatiert werden (vgl. Kap. 1.14 und Kap.1.15).

### 1.13 HERV-K und Tumorassoziation

Die Beteiligung endogener Retroviren an der Tumorgenese bei Hühnern und Mäusen ist seit langer Zeit unumstritten (Vogt et Fries, 1971; Fields and Howley, 1996). Neoplasien der Brustdrüse der Maus werden durch das Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) induziert. Aufgrund der Verwandtschaft des HERV-K mit dem MMTV kann bereits eine Beteiligung von HERV-K an der Tumorgenese humaner Karzinome in Erwägung gezogen werden. Der Nachweis von HERV-K Transkripten und retrovirusähnlichen Partikeln in humanen Mammakarzinomzelllinien liefert möglicherweise ein Indiz dafür (Seifarth et al. 1995). Die bislang deutlichste Korrelation besteht zwischen der Expression viraler Transkripte aus dem *env*-Leserahmen von HERV-K(HML-2) und der Tumorgenese (Herbst et al., 1996, 1998). Galli et al. (2005) gelang der Nachweis zwischen der Expression von *rec*, einem Spleißprodukt aus dem *env*-Leserahmen von HERV-K(HML-2) und der Entstehung von Keimzelltumoren in Mäusen. Genetisch veränderte Mäuse, welche endogen das *rec*-Gen in allen Zellen tragen und dessen Expression induziert wurde, entwickelten Hodentumore. Diese transgenen Mäuse zeigten in einem Alter von etwa 12 Monaten erste histopathologische Veränderungen und entwickelten in einem Alter von 18 Monaten Hodentumore. Dies ist ein eindeutiger Hinweis für eine Tumorinduktion durch ein humanes endogenes Retrovirus. Bereits die Arbeiten von Boese et al. zeigten im Jahre 2000, daß die Expression von *rec* das Tumorstadium fördert. So ließ sich nachweisen, daß in immundefizienten Mäusen *rec*-exprimierende Rattenfibroblasten nach subkutaner Injektion zu Tumoren auswuchsen (Boese et al., 2000).



Abbildung 4: Tumorbildung nach subkutaner Injektion von *rec*- exprimierenden Rattenfibroblasten bei immunsupprimierten Mäusen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Müller-Lantzsch).

Deutliche Hinweise existieren auch für eine Korrelation zwischen HERV-K und der humanen Karzinogenese. Heimdal postulierte 1997 eine Prädisposition für *Carcinoma-in-situ* Läsionen als Folge einer frühen Störung der Spermatogenese, wobei diese Vorläuferläsion wiederum die Entstehung von Keimzellneoplasien wie Seminome und Teratokarzinome begünstigt (Heimdal et al., 1997; Herbst et al., 1998). Im Serum von Patienten mit Keimzelltumoren und Seminomen konnten spezifische Antikörper gegen Env- bzw. das Gag-Protein von HERV-K detektiert werden. Nach Entfernung des Tumors senkte sich der Antikörpertiter (Sauter et al., 1996). Die HERV-K Expression stellt folglich einen Marker für das Vorliegen eines Keimzelltumors dar.

Aus dem *env*-Leserahmen eines anderen HERV-K-Types wurde ein weiteres Gen, das *np9* identifiziert. Np9 wird in fast allen Tumorgeweben, insbesondere aber in Keimzell- und Mammakarzinomen und transformierten Zelllinien exprimiert, nicht dagegen in normalen Zellen und nicht transformierten Zelllinien (Armbrüster et al., 2002). Bislang existieren jedoch keine genaueren Erkenntnisse über einen kausalen Zusammenhang zwischen der Expression von Np9 und der Tumorgenese (vgl. Kap.1.15).

### 1.14 Genprodukte des HERV- K

Löwer et al. konnte bereits im Jahr 1984 virale Partikel in Überständen von Teratokarzinomzelllinien isolieren. 1993 konnten diese HTDV-Partikel (human teratocarcinoma-derived virus) von Boller et al. als HERV-K (HML-2) kodierte Partikel charakterisiert werden. 1995 konnten von Sauter et al. sowohl in der Zelllinie Tera-1 als auch im Gewebe von Seminompatienten Proteine nachgewiesen werden, welche von dem *gag*-Leserahmen von HERV-K kodiert wurden. Im gleichen Jahr wurde von Lower et al. ein weiteres Gen aus dem *env*-Leserahmen von HERV-K Typ 2 Proviren identifiziert und dessen Expression in verschiedenen Keimzelltumor-abgeleiteten Zelllinien mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Lower et al., 1995). Mit Hilfe dieses damals als cORF (central open reading frame), heute als Rec bezeichneten Proteins, konnte erstmals ein mehrfach gespleißtes Produkt aus der HERV-K (HML-2)-Familie nachgewiesen werden, welches ein typisches Merkmal komplexer Retroviren darstellt und damit der bisher erfolgten Charakterisierung der HERV-K (HML-2) als einfache Retroviren entgegenläuft. Das etwa 14,5 kDa große Rec-Protein teilt das erste Exon mit dem N-Terminus von Env. Das zweite Exon wird ebenfalls vom *env*-Leserahmen kodiert, allerdings in einem unterschiedlichen Leseraster translatiert (vgl. Abb. 5). Für Rec wurde eine regulatorische, Rev/Rex homologe Funktion postuliert, da das Protein in den Nukleoli lokalisiert ist und über potentielle Domänen für Kernimport-, export und RNA-Bindung verfügt (Lower et al., 1995). Es ist in der Lage, HERV-K(HML-2) Vollängentranskripte zu binden und deren Export ins Cytoplasma zu vermitteln (Magin et al., 1999). Weitere Untersuchungen zeigten außerdem, daß Rec analog den Rev/Rex- Proteinen in Abhängigkeit von Crm1 aus dem Zellkern exportiert wird und dabei ein leucinreiches, Rev-ähnliches Kernexportsignal (NES) involviert ist (Boese et al., 2000b). Auch eine Multimerisierung des Proteins, wie es für die Funktionalität der Rev/Rex-Proteine erforderlich ist, konnte für Rec nachgewiesen werden (Boese et al., 2001). Bei der Durchmusterung einer Testis-cDNA-Bank mit Rec als Fänger konnte das promyelozytische Leukämie Zinkfinger Protein (PLZF) als ein potentieller Bindungspartner von Rec identifiziert werden. PLZF wird in hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert und ist in verschiedene zelluläre

Prozesse der Differenzierung, Proliferation und Apoptose involviert (Reid et al., 1995, Melnick und Licht, 1999). Weiterführende Untersuchungen an Mäusen lassen außerdem eine Beteiligung von PLZF an Testishypertrophien, atypischer Spermatogenese mit Sterilität sowie an Skelettdeformationen vermuten (Hawe et al., 1996; Barna et al., 2000). Jüngsten Publikationen zufolge ist PLZF für die Selbsterneuerung von Keimbahnstammzellen erforderlich. Die Expression von PLZF hält die Zelle in undifferenziertem Zustand, bei Verlust geht diese auf Kosten der Selbsterneuerung in die Differenzierung über (Buaas et al., 2004; Costoya et al., 2004).

Im Rahmen der Forschungsarbeiten zur spezifischen Expression des *rec*-Gens in Keimzelltumoren wurde in der Arbeitsgruppe um Müller-Lantzsch von Armbrüster et al. (2002) ein weiteres Spleißprodukt aus dem *env*-Leserahmen von HERV-K charakterisiert: das *np9* (vgl. Abb.5).

### 1.15 Das HERV-K Gen *np9*

Sequenzanalysen zeigen, daß Np9 sein erstes Exon mit den ersten 14 Aminosäuren von Env und Rec teilt, die Translation des zweiten Exons aus einem von Rec und Env unterschiedlichen Leseraster entstammt (vgl. Abb.5) Innerhalb des zweiten Exons, welches für 59 weitere Aminosäuren kodiert, wurden drei als NLS's bezeichnete Kernlokalisations-signale identifiziert. Mit Hilfe des fluoreszenzbasierten Zelllokalisations-Assay konnte eine nukleäre Lokalisation von Np9 bestätigt werden, so daß zumindest eines der NL-Signale noch funktionell sein muß. Aufgrund der distinkten Lokalisation in subnukleären Strukturen, welche als Nukleoli der Zelle identifiziert wurden (Armbrüster et al., 2002) und des berechneten Molekulargewichtes von ca. 9 kDa wurde das neue Protein der HERV-K (HML-2)-Familie als Np9, für nukleäres Protein von 9 kDa bezeichnet. Auffällig ist in diesem Zusammenhang die Korrelation zwischen der gewebespezifischen Expression von *np9* und neoplastisch entarteten Zellen aus Keimzelltumoren, Mammakarzinomen und von Leukämiepatienten (Armbrüster et al., 2002). Kein Nachweis für Np9 konnte hingegen in Normalgewebe und nicht transformierten Zelllinien erbracht werden. Das Protein interagiert mit der E3

Ubiquitin Ligase LNX, welche wiederum mit Numb interagiert (Armbrüster et al., 2004). Numb wird eine wichtige Funktion bei der asymmetrischen Zellteilung in der Embryonalentwicklung zugeschrieben und fungiert dabei als Antagonist im Notch-Signalweg. Notch besitzt dabei eine essentielle Bedeutung in der Gonozytendifferenzierung und damit der Tumorgenese (Dho et al., 1998). Es existieren derzeit jedoch noch keine weiteren Erkenntnisse zur Funktion von Np9 in der Tumorgenese über die LNX/Notch/Numb-Signalkette.

### 1.16 Die humane Serin-Protease HtrA (HumHtrA)

1989 beschrieben Lipinska et al. erstmals eine prokaryotische, durch Hitzeschock induzierbare, membran-assoziierte Serin-Protease (HtrA), welche im Periplasma von *E.coli* lokalisiert ist. Temperaturabhängig übt diese dabei zwei unterschiedliche Funktionen aus. Bei hohen Temperaturen liegt ihre Aufgabe im Abbau nicht korrekt gefalteter Proteine, bei niedrigen Temperaturen arbeitet diese hingegen als Chaperon. Ein Proteinabbau erfolgt ausschließlich für den Fall, daß eine Rückfaltung in den physiologischen Zustand nicht möglich ist (Suzuki et al., 2001). Für die Substraterkennung wird die PDZ-Domäne im C-Terminus von HtrA verantwortlich gemacht (Pallen et al., 1997). In Eukaryoten werden PDZ-Domänen ebenfalls für die Protein-Protein-Interaktion verantwortlich gemacht (Fanning et Anderson, 1996). Die Bezeichnung „PDZ-Domäne“ wird abgeleitet von den drei Proteinen, in denen sie zum ersten Mal identifiziert wurden. (PSD-95, disc-large and ZO-1). PDZ-Domänen sind ca. 90 Aminosäuren große Bereiche in Proteinen, die häufig an membran-assoziierten Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind oder phosphatase- bzw. kinaseanaloge Funktionen ausüben (Harris and Lim, 2001; Hata et al., 1998; Hung and Sheng, 2002). Sie besitzen keine spezifische Sequenz, kodieren in der Regel jedoch für 2  $\alpha$ -Helices und 6  $\beta$ -Faltblattstrukturen, sowie ein konserviertes GLGF-Motiv am Übergang des  $\beta$ A- und  $\beta$ B-Loops (Cowburn, 1997; Hung and Sheng, 2002), das häufig die Interaktion mit den Liganden vermittelt. Nachweislich besitzen Bakterien ohne

HtrA bei einer Kultivierung in einem erhöhten Temperaturbereich ab etwa 42°C eine verminderte Lebensfähigkeit (Skarkoglowck et al., 1997).

Homologe Strukturen der Serin-Protease sind auch für den eukaryotischen Organismus nachgewiesen worden (Fanning et Anderson, 1996). Beim Menschen lassen sich bis zum heutigen Zeitpunkt drei Mitglieder aus der Familie der humanen Serin-Protease HtrA (HumHtrA) unterscheiden: Die humane Serin-Protease HumHtrA1, HumHtrA2 und HumHtrA3, deren Genloci, in entsprechender Reihenfolge, auf Chromosom 10, Chromosom 2 und Chromosom 4 identifiziert wurden. (Verhagen et al., 2002; Gray et al., 2000; Nie et al., 2003).

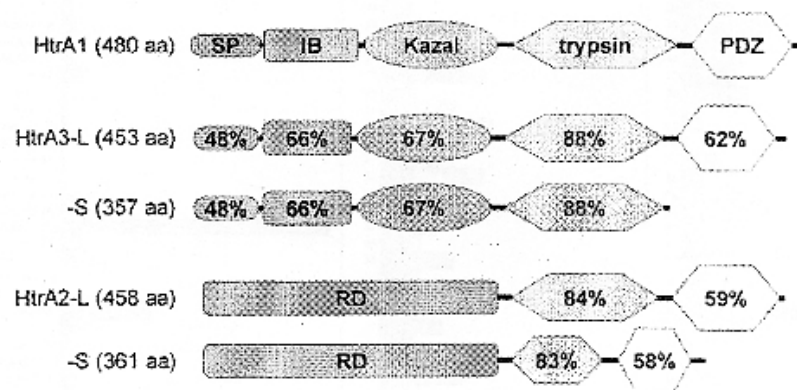


Abbildung 6: Isoformen und Strukturdomänen der humanen Serin-Protease HtrA (HumHtrA) (Nie et al., 2003).

Bereits auf den ersten Blick läßt sich die strukturelle Ähnlichkeit zwischen den drei Mitglieder aus der HtrA-Familie und den entsprechenden Isoformen erkennen, die prozentualen Angaben belegen den hohen Homologiegrad.

Ein Vergleich der Domänen zeigt, daß die lange Isoform der HtrA3 (L-Form) der HtrA1-Form, von welcher bislang nur eine Isoform beschrieben wurde, sehr ähnlich ist. Beide Formen tragen ein Signalpeptid (SP), eine IGF-bindende Domäne (IB), eine Kazal Typ S Protease inhibitorische Domäne (Kazal), eine Trypsin (trypsin) und eine PDZ Domäne (PDZ). Die kurze Isoform der HtrA3 (S-Form) ähnelt der HtrA1 bis auf das Fehlen der PDZ-Domäne. HtrA2 ist strukturell jedoch völlig verschieden von den beiden anderen HtrA-Typen. Der N-Term von HtrA2 enthält eine regulatorische



Domäne (RD), es fehlen jedoch die SP-, die IB- als auch die Kazal Typ S Domäne. Die Isoformen der HtrA2 unterscheiden sich voneinander wiederum am C-terminalen Ende; zwar besitzen beide Formen eine Trypsin und eine PDZ Domäne, diese sind jedoch bei der kurzen Isoform verkürzt. Im Vergleich dazu sind die beiden Isoformen der HtrA3 bis auf das Fehlen der PDZ Domäne absolut identisch. Ein Vergleich der Trypsin Domänen aller HtrA-Formen zeigt, daß es sich hierbei um eine hochkonservierte Gensequenz von ca. 100 Basenpaaren handelt, die bei allen Isoformen der Serin-Protease, für welche eine proteolytische Aktivität nachgewiesen werden kann, vorhanden ist. Diese kodiert für zwei definierte Konsensusmotive und eine katalytische Triade, bestehend aus einem Histidin-, Aspartat-, und einem Serin- Rest (Gray et al., 2000; Nie et al., 2003). Der kurzen Isoform der HtrA2 fehlt jedoch eine 64 Basenpaar umfassende Sequenz zwischen der für die zweite und dritte katalytischen Triade kodierenden Sequenz, so daß eine proteolytische Aktivität für diese Form nicht nachgewiesen werden konnte (Faccio et al., 2000). Daraus läßt sich schlußfolgern, daß neben der für die katalytische Triade kodierenden Basensequenz auch der unmittelbare genetische Kontext von entscheidender Bedeutung für die proteolytische Aktivität der Serin-Protease ist.

Basierend auf den strukturellen Unterschieden lassen sich auch unterschiedliche Funktionen aus den drei HtrA Formen ableiten. Einzigartig ist die lediglich bei der HtrA2-Familie vorkommende N-terminale RD Domäne, welche ihren Namen aufgrund der Homologie zu Proteinen aus der Reaper-Familie trägt. Diese wiederum besitzen die Fähigkeit, eine Bindung an inhibitorische Apoptoseproteine (IAPs) einzugehen, was zu deren Inaktivierung führt. IAPs verhindern physiologischer Weise den Zelltod, in dem sie an Caspasen binden, welche die Effektorproteine der Apoptose darstellen (Deveraux et al., 1999, Suzuki et al., 2001). Somit läßt sich die proapoptotische Fähigkeit von HtrA2, welche von Verhagen et al. im Jahre 2002 nachgewiesen wurde, anschaulich nachvollziehen. Weiterhin wird HtrA2 eine Bedeutung bei der Stressantwort der Zelle zugeschrieben (Gray et al., 2000). Zellen, welche zellulärem Stress durch UV-Licht, Antibiotikabehandlung mit Tunicamycin oder oxidativem Streß durch Minderperfusion des Gewebes mit Sauerstoff ausgesetzt wurden, zeigten eine Hochregulation von HtrA2 in

der Zelle (Gray et al., 2000). Die Lokalisation der HtrA2 wird von Gray et al. im Nukleus der Zelle beschrieben und HtrA2 eine potentielle Bedeutung im Abbau nukleärer Proteine bei zellulärem Stress zugesprochen (2000). Im Gegensatz dazu wird eine membran-assoziierte und im intermembranalen Raum der Mitochondrien lokalisierte HtrA2 beschrieben, die bei zellulärem Stress in die Mitochondrien importiert und nach Autoproteolyse, bei welcher die ersten 133 Aminosäuren abgespalten werden, in reifer Form in das Cytoplasma transportiert wird (Suzuki et al., 2001).

Die Bedeutung von HtrA1 ist bislang größtenteils unklar. Als sekretorisches Protein wird HtrA1 eine Bedeutung am Abbau extrazellulärer Matrixproteine zugeschrieben; dies konnte durch Untersuchungen von an rheumatischer Arthritis erkrankten Patienten belegt werden (Clausen et al., 2002).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von HtrA1 und HtrA3 kann eine ähnliche Funktion beider Mitglieder vermutet werden. Beide HtrA Formen werden unter anderem in hohem Maße in der Plazenta exprimiert (Nie et al.; 2003) und zeichnen sich durch den Besitz einer IGF-bindenden Domäne aus. Nachweislich sind aber IGF-Faktoren in der Lage, sowohl das fötale-, als auch das plazentäre Wachstum restriktiv zu beeinflussen (Constancia et al., 2002). Das Fehlen von IGF-Faktoren, welches experimentell durch Deletion entsprechender Gene induziert wurde, führte zu einem vermindertem Wachstum beider Gewebetypen. Die genaue Funktion der HumHtrA1 und HumHtrA3 im Rahmen der Implantation als auch Plazentation steht jedoch bislang noch aus.

### **1.17 Ziele der Arbeit**

Um Hinweise auf eine Funktion von Np9 in der Zelle zu erhalten, wurde in Vorarbeiten mit Hilfe des Hefe-II-Hybrid System nach zellulären Interaktionspartnern des Np9-Proteins gesucht. Die Sequenzierung von über zwanzig positiven Klonen identifizierte neben einigen unspezifischen Sequenzen vier der Klone mit fast 100% iger Homologie als den C-Terminus von LNX, eine weitere Sequenz wurde als Fragment der humanen Serin-Protease HumHtrA2-L Form, im Folgenden als HtrA2 bezeichnet, identifiziert

(Nie et al., 2003). Der Nachweis einer spezifischen Bindung zwischen Np9 und LNX wurde bereits bestätigt (Armbrüster et al., 2004). Kontrollversuche im Hefe-II-Hybrid System zeigten neben einer hochspezifischen Aktivierung des *lacZ*- eine unspezifische Aktivierung des *leu2*- Reportergens, so daß die Spezifität der Bindung von HtrA2 und Np9 verifiziert werden muß.

Im Rahmen dieser Dissertation soll schwerpunktmäßig eine spezifische Bindung zwischen Np9 und der HtrA2 durch eine GST-Pulldown-Analyse bestätigt werden und die Interaktion beider Proteine mit Hilfe eines Zelllokalisations-Assay nachgewiesen werden. Primäres Ziel ist die Vervollständigung des HtrA2-Teilklons zu einer Gesamtlänge von etwa 1400 bp. Mit Hilfe der PCR sollen hierzu aus einer Testis cDNA Bank drei Teilklone amplifiziert werden, welche nach dem Verdau mit diversen Restriktionsendonukleasen sequentiell in den Vektor pUC18 ligiert werden. Die Prüfung auf Vollständigkeit dieses artifiziellen Klons erfolgt nach Klonierung durch Sequenzierung in pGEM.

Eine spezifische Bindung zwischen Np9 und der HtrA2 soll durch Affinitätschromatographie in Form einer GST-Pulldown-Analyse biochemisch nachgewiesen werden. Zu Beginn dieser Arbeit stand Np9 bereits als pGEX-Np9-Konstrukt und somit nach Expression in Bakterien in Form des GST-Fusionsprotein als Kopplungspartner an die Sepharosematrix zur Verfügung. Die Funktion des potentiellen Bindungspartners übernimmt damit die HtrA2, welche zu diesem Zweck in den pSG5-Vektor kloniert werden muß. Mit Hilfe dieses Vektorsystems ist eine spezifische Induktion der *in-vitro* Transkription/Translation möglich, im Rahmen derer ein gezielter Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren stattfinden kann. Im Falle einer Bindung wird diese autoradiographisch durch Schwärzung eines Röntgenfilms als spezifische Bande charakteristischer Größe nachgewiesen.

Zur Charakterisierung der zellulären Lokalisation des Teilfragmentes (HtrA2frag) und des Vollklons (HtrA2ges) mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sollen beide Klone in „Farbvektoren“ ligiert werden. Bei diesen Vektoren handelt es sich um pEGFP-C1 und pDSRed-C1, welche für ein grün- bzw. rotfluoreszierendes Fusionsprotein kodieren. Durch Transfektion der eukaryotischen Konstrukte in Cos-1 Zellen ist die gezielte Expression beider HtrA2-Klone als Fusionsprotein möglich. Durch

---

Kotransfektion der Zellen mit Np9 und HtrA2 sollen im Rahmen einer Kolokalisation-Analyse Anhaltspunkte für eine Interaktion beider Proteine erzielt werden.

## 2 Material

### 2.1 Enzyme und Oligonukleotide

Alkalische Phosphatase	Boehringer
DNase I	Boehringer
dNTP`s	Boehringer
Pfu- Polymerase	Promega
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs Inc.
Superscript II RT	Invitrogen
Taq- Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech
T4-DNA-Ligase	Promega
Viralex Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH

### 2.2 Puffer

GST-Kopplungspuffer: (low-salt)	20 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% NP40
GST-Kopplungspuffer: (high-salt)	50 mM Tris/HCl pH 7,5; 200 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,1% NP40
Lysispuffer:	10 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,14 mM NaCl; 3 mM MgCl <sub>2</sub> 0,5% NP40
PBS-Puffer:	140 mM NaCl; 25 mM KCl; 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM CaCl <sub>2</sub> ; 10 mM Na/K-PO <sub>4</sub> ; pH 7,5
SDS-Laufpuffer:	200 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,05% SDS; pH 8,2
SDS-Transferpuffer:	200 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,1% SDS, 20% Methanol pH 8,2-8,6

---

TAE-Puffer (50x):	2 M Tris/HCl; 250 mM Natriumacetat; 500 mM EDTA; pH 7,8
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 7,6
Uppergelstock:	0,5 M Tris/HCl; 0,4% Natriumdodecylsulfat (SDS); pH 6,8
2x- Probenpuffer:	6,3% SDS (v/v); 2,5% Uppergelstock (v/v); 10% Mercaptopropandiol (v/v); 10% Glycerin (v/v)

## 2.3 Molekulargewichtsmarker

### 2.3.1 DNA- Molekulargewichtsmarker

Zur Bestimmung der Größe doppelsträngiger DNA-Moleküle in einem Bereich von 0,1-12 kb wurde der 1 kb+ Marker der Firma Invitrogen verwendet. Dieser enthält DNA-Fragmente folgender Größe:

12 / 11 / 10 / 9 / 8 / 7 / 6 / 5 / 4 / 3 / 2 / 1,65 / 1 / 0,85 / 0,65 / 0,5 / 0,4 / 0,3 / 0,2 und 0,1 Kb.

### 2.3.2 Proteinmolekulargewichtsmarker

Eingesetzt wurde der „low molecular weight“ Marker (LMW) der Firma Pharmacia; dieser enthält Proteinmarker folgender Molekulargewichte:

94 / 67 / 43 / 30 / 20,1 und 14,3 kDa.

Im Rahmen der GST-Pulldown-Analyse wurde der radioaktive Marker <sup>14</sup>C-methylated protein marker der Firma Amersham verwendet; dieser enthält <sup>14</sup>C markierte Proteine folgender Molekulargewichte:

200 / 92,5 / 68 / 46 / 30 und 14 kDa.

## 2.4 Bakterienstämme und Nährmedien

Zu Klonierungszwecken und Amplifikation von Plasmiden wurde der *E.coli* Stamm pMOSblue (Amersham, pMOS-blue T-vector-Kit) verwendet, zur Proteinexpression der *E.coli* Stamm BL21DE3 (Studier und Moffatt, 1986) . Die Kultivierung erfolgte in Luria- Broth- Medium oder auf Luria- Broth- Agarplatten der Firma Invitrogen. Zur Selektion rekombinanter Bakterien wurden restriktive Wachstumsbedingungen durch Zugabe von Ampicillin bzw. Kanamycin erzeugt.

## 2.5 Zelllinien

Cos-1: „African green monkey cells“, von Nierenzellen abgeleitete Fibroblasten- ähnliche Zelllinie (Gluzman, 1981)

Raji: Humane EBV positive B-Zelllinie etabliert aus einem Burkitt-Lymphompatienten (Pulvertaft, 1965).

## 2.6 Nährmedium

Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien

LB-Medium: Luria broth base:2,5%

LB-Platten: Luria`s Agar :3,75%

Zugabe von Ampicillin bzw. Kanamycin zur Herstellung selektiver Wachstumsbedingungen

Nährmedium zur Kultivierung von Säugerzellen

DMEM: Die Zelllinie Cos-1 wurde in DMEM (PAA Laboratories GmbH) Medium zuzüglich 10% fetalem Kälberserum (Invitrogen), 1% Na-pyruvat

und 4er Antibiotikum (40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat) kultiviert.

## 2.7 Oligonukleotide

Primer (MWG/Biotech)

Die nachfolgend aufgelisteten Primer wurden im Rahmen der PCR verwendet:

SerSphfor: 5`- CCCCAGCATGCCTGACGTC - 3`  
 Serfor-2: 5`- TGATGGCTGCGCCGAGGGCG - 3`  
 SerBamfor: 5`- CACAGCTGTGGATCCCGTGG - 3`  
 SerHind3for: 5`-CGCGCGAAGCTTTGATGGCTGCGCCGAG-3`  
 SerEGFPEcofor: 5`- GCGCGCGAATTCGACACAATTCCC- 3`  
 SerSacfor: 5`-CGCGCGGAGCTCAAATGGCTGCGCCGA-3`  
 SerGesBglfor: 5`-CGCGCGAGATCTATGGCTGCGCCGAGGG3  
 SerBamrev: 5`-CCACGGGATCCACAGCTGTG - 3`  
 SerSphRev: 5`-GACGTCAGGCATGCTCGGGG-3`  
 SerGesBamRev: 5`-CGCGCGGATCCAACAGAATCTCAAGGCAGAAG-3`  
 SerKpnrev: 5`-CGCGCGGGTACCTCATTCTGTGACCTC-3`  
 SerBglRev: 5`-GCGCGAGATCTCTCTCGAAGACGATC-3`  
 SerGesBglRev: 5`-CGCGCGAGATCTTCATTC-3`

## 2.8 Vektoren und Konstrukte

### 2.8.1 Parentale Vektoren

pEGFP-C1: Eukaryotischer Expressionsvektor (Clontech) zur Expression eines grün-fluoreszierenden Fusionsprotein mit C-terminalen Anteil des *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP).  
 pDsRed-C1: Eukaryotischer Expressionsvektor (Clontech) zur Expression eines rot-fluoreszierenden Fusionsprotein mit C-terminalen Anteil des rot-fluoreszierenden Fluorochroms.



- pGEX-4T-1: Prokaryotischer Expressionsvektor (Amersham / Pharmacia / Biotech) zur Expression eines GST-Fusionsprotein (Glutathion-S-Transferase), welches im GST-Pulldown die Kopplung an die Sepharosematrix gewährleistet. Das Fusionsgen steht unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren tac-Promotors.
- pJG4-5: Eukaryotischer Hefevektor (Clontech) zur Expression eines Fusionsprotein mit N-terminalen Anteil der transaktivierenden Domäne des Gal4 Transkriptionsfaktors. Das Fusionsgen steht unter Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Gal-1 Promotors und kodiert für das Markergen *trp-1*, das der rekombinanten Hefezelle das Wachstum in tryptophanfreiem Medium ermöglicht.
- pSG5: Eukaryotischer Expressionsvektor (Stratagene) zur transienten Genexpression unter Kontrolle des T7-Promotors des Simian-Virus 40 (SV40).

### 2.8.2 Konstrukte

Folgende Konstrukte standen zu Beginn dieser Dissertationsarbeit bereits zur Verfügung:

- pGEX-Np9 : Das Konstrukt wurde nach den Angaben Kap.2.11.4 der Dissertationsarbeit von V. Armbrüster kloniert.
- pEGPFP-C1- Np9 : Das Konstrukt wurde nach den Angaben Kap.2.11.4 der Dissertationsarbeit von V.Armbrüster kloniert.
- pSG5-HA: In diesen modifizierten Vektor wurde in die *Bam* HI- site ein HA-Tag über *Bam* HI/ *Bgl* II kloniert (zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Müller-Lantzsch. Das HA-Tag ermöglicht durch Expression als Teil eines Fusionsprotein eine gezielte Detektion durch spezifische Antikörper im Rahmen eines Western-Blots.

pSG5-HA-CB: Dieses Konstrukt kodiert für den humanen Spleißfaktor 61K(Accession No.: AY040822) mit C- terminalen Tag und wurde von Dr. U. Galli aus der Arbeitsgruppe m Prof. Dr. Müller-Lantzsch zur Verfügung gestellt.

pJG46L-SPfrag : Dieses Konstrukt enthält den mit Hilfe des Hefe-II-Hybrid Systems identifizierten Teilklon der SPfrag.

## 2.9 Reagenzien und "Testkits"

### 2.9.1 „Kits“ und Transfektionsreagenzien

- |  |                    |
|--|--------------------|
| - FuGene-6 <i>transfection reagent</i>   | Roche              |
| - <i>Gene-clean</i> - Kit  | Dianova            |
| - Lipofectamin 2000 <i>transfection reagent</i>  | Invitrogen         |
| - NucleoSpin® Extract  | Macherey und Nagel |
| - Nucleobond Plasmidextraktion   | Macherey und Nagel |
| - Superscript II <i>reverse transcription</i>  | Invitrogen         |
| - T7- TNT <i>reticulocyten-coupled</i><br><i>in vitro transcription and translation system</i> | Promega            |

### 2.9.2 Radiochemikalien

- |  |     |
|--|-----|
| - <sup>35</sup> S- translabled Methionin/Cystein | ICN |
|--|-----|

### 2.9.3 Photochemikalien

- |                                |                   |
|--------------------------------|-------------------|
| - ECL-Hyperfilm                | Amersham          |
| - Röntgen-Enwickler Konzentrat | ADEFO Chemie GmbH |
| - Röntgen-Fixier- Konzentrat   | ADEFO Chemie GmbH |
| - X-Omat-Röntgenfilm           | Kodak             |

## **2.10 Mikroskope, Computersoftware und Internetseiten**

Das Zelllokalisations-Assay wurde mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskopes vom Typ „Leica DM IRB/E Mikroskop“ (Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie, Uniklinik Homburg) vorgenommen. Die Dokumentation erfolgte mit der Axio-Cam Color Kamera der Firma Zeiss und der angeschlossenen Software Axio Vision 3.0. Die anschließende Bildbearbeitung erfolgte mit PhotoPaint 9 und PowerPoint von Windows 98. Ferner wurde folgende Computersoftware verwendet: Microsoft Windows 98, Corel Draw 9, Sigmaplot und Netscape 4.7.

## 3 Methoden

### 3.1 DNA-Techniken

#### 3.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

(Maniatis et al., 1989)

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes. Durch den parallelen Einsatz eines DNA- Molekulargewichtsmarkers als Referenz, ist eine Abschätzung der Größe der Einzelfragmente möglich. Die Wahl einer geeigneten Agarose-Konzentration ermöglicht eine Optimierung der Auftrennung von Fragmenten in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes. In dieser Arbeit werden DNA- Fragmente von 100 bis 1000 bp in 3%igem Agarosegel, DNA-Fragmente über 1 kb in 1%igem Agarosegel aufgetrennt. Die Agarose wird in 1x TAE Puffer durch Kochen gelöst und bei einer Temperatur von etwa 55 °C der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (Endkonz. 0,5 µg/ml) zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in den Doppelstrang der DNA-Helix und ermöglicht auf diese Weise den visuellen Nachweis im UV-Licht. Zur Sichtbarmachung der Laufstrecke der DNA-Fragmente im Gel werden die DNA-Ansätze mit 20%iger (v/v) Blaumarker-Stammlösung (50% Glycerin (v/v); 50 mM EDTA; 0,25% Bromphenolblau (v/v)) versetzt. Die DNA- Fragmente werden bei einer angelegten Spannung von maximal 110 Volt elektrophoretisch aufgetrennt und in kurzwelligem UV-Licht (254 nm) photographisch dokumentiert.

#### 3.1.2 Aufreinigung der DNA aus Agarosegel

Zur präparativen Aufarbeitung der DNA werden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Fragmente in langwelligem UV-Licht (366nm) aus dem Agarosegel isoliert. Zur Aufreinigung der DNA aus Agarosegel existieren zwei unterschiedliche Methoden. Die Reisolierung der DNA-Fragmente mit einer

Größe *über* als 1 kb erfolgt nach der „GeneClean- Methode“ der Firma Dianova. Bei dieser Aufreinigung bindet die negativ geladene DNA an eine Matrix aus positiv geladenen Glasmilchkügelchen. DNA-Fragmente, mit einer Größe *unter* 1 kb werden mit Hilfe des „Nucleospin-Kits“ nach Angaben der Firma Macherey und Nagel reisoliert. Bei dieser Methode bindet die DNA nach dem Prinzip der Ionenaustausch-Chromatographie an positiv geladenen Ionenaustauschersäulen. Die gereinigte DNA wird anschließend durch Zugabe von 1x TE Puffer eluiert.

### 3.1.3 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

(Saiki et al., 1988, Graham 1973)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ermöglicht die gezielte *in-vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten bis zu einer maximalen Größe von etwa 12 kb. Die Vervielfältigung doppelsträngiger DNA verläuft dabei exponentiell. Zu Beginn der Reaktion wird die eingesetzte doppelsträngige DNA-Matrize durch kurzzeitiges Erhitzen auf über 90°C in Einzelstränge denaturiert. Im anschließenden Anlagerungsschritt binden spezifische Oligonukleotide, die sogenannten Primer, an komplementäre Sequenzen der „*template*“- DNA. Die für diesen als „*annealing*“ bezeichneten Schritt eingesetzte Temperatur ist von der Basenzusammensetzung und Größe der verwendeten Primer abhängig. Zur Initiation der Transkription werden jeweils zwei spezifische Primer benötigt, die zu jeweils einem der Matrizenstränge komplementär sind. Nach der Bindung beider Primer, werden die freien 3'-Enden durch die Polymerase- komplementär zu dem jeweiligen Matrizenstrang- synthetisiert. Dieser als „*Elongation*“ bezeichnete Vorgang wird bei einer für die eingesetzte Polymerase spezifischen Arbeitstemperatur durchgeführt. Die verwendbaren Enzyme stammen aus thermophilen Mikroorganismen und arbeiten aus diesem Grund optimal in einem Temperaturbereich zwischen etwa 68°C und 73°C. Nach dem Elongationsschritt wiederholt sich der aus Denaturierung, Annealing und Elongation bestehende Zyklus. Die exponentielle Vermehrung des spezifischen dsDNA-Amplifikats erfolgt bei durchschnittlich 30

Wiederholungen des Zyklus. Die PCR wurde im Peltier Thermal Cycler PTC 200 der Firma MJ Research durchgeführt. In einen PCR-Durchlauf sind für einen 20 µl Ansatz 1 µg DNA, 0,1 U Taq DNA-Polymerase, 2 µl 10 Taq-Puffer, dNTP's in einer Konzentration von jeweils 0,2 mM und die jeweiligen Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 0,5 µM eingesetzt worden. Zur präparativen DNA-Amplifikation werden Ansätze mit Endvolumina von 100 µl verwendet.

#### 3.1.4 DNA-Sequenzierung

Zur Bestimmung von DNA-Sequenzen wurden diese zur Sequenzierung bei der Firma GATC-Biotech AG in Konstanz in Auftrag gegeben.

#### 3.1.5 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Maniatis et al., 1989)

Restriktionsendonukleasen (RE's) sind Enzyme, die hochspezifisch Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und diese durch Spaltung der Phosphodiesterbindungen schneiden. Die Nomenklatur der RE's bezieht sich auf die prokaryotischen Organismen, aus denen sie isoliert wurden. Natürlicherweise schützen sie das Genom dieser Organismen vor Integration fremder DNA, indem sie artfremde Moleküle durch Zerschneiden zerstören. Die Erkennung von artfremder und eigener DNA erfolgt auf der Basis von unterschiedlichen Methylierungsmustern. Der Restriktions-Verdau erfolgt mit 0.5 µg DNA für einen analytischen Ansatz bzw. bis zu 10 µg zu präparativem Zweck mit jeweils 2 bzw. 10 µl 10-fach Restriktionspuffer mit 2-5 U's Enzym pro µg DNA in einem 20 µl bzw. 100 µl Ansatz. Alle Ansätze wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 3.1.6 Phosphatasebehandlung von Vektoren (Bolivar et al., 1977; Chaconas und van de Sande, 1980)

Die Dephosphorylierung der freien 5'OH-Enden der linearisierten Vektoren dient dem Verhindern einer Religation des Vektors; aufgrund der fehlenden

Phosphatgruppen sind diese nicht mehr in der Lage zu rezirkularisieren. Die Dephosphorylierung wird mit Hilfe der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) nach den Angaben der Firma Boehringer vorgenommen. Die Vektoren wurden durch Gelelektrophorese und anschließender „GeneClean“ Reisolierung aufgereinigt.

### 3.1.7 Ligation von DNA- Fragmenten

(Sgaramella et al., 1970; Dugaiczky et al., 1975)

Während einer Ligation wird die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente durch das Enzym Ligase katalysiert. In dieser Arbeit wurde hierzu die aus dem T4-Bakteriophagen stammende T4-Ligase (Biolabs) verwendet. Für die ATP-abhängige Reaktion sind äquimolare Mengen an dephosphoryliertem Vektor und dem zu inserierenden DNA-Fragment mit 100 U Enzym in 1x T4-Ligase-Puffer (Biolabs) eingesetzt und bei 4°C mehrere Stunden inkubiert worden. Nach erfolgreicher Ligation werden zur Amplifikation des Plasmids Bakterien transformiert.

### 3.1.8 Analytische Isolierung von Plasmid- DNA aus Bakterien

(Minipräparation nach Holmes und Quigley, 1982)

Diese Methode dient der Isolierung geringer Plasmid- DNA Mengen aus Bakterien. Nach Transformation von *E.coli* pMOS-Kulturen werden die Transformanten auf LB-Agarplatten unter selektiven Bedingungen kultiviert und Einzelkolonien in je 1.5 ml LB- Medium bei 37°C über Nacht vermehrt worden. Nach Zentrifugation der Bakterien (5 min, 4000 rpm [Sigma 202MK]), werden die Pellets in je 200 µl STET-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM EDTA; 5% Triton-X 100 (v/v), 250 mM Sucrose) in Gegenwart von Lysozym (Endkonzentration 500 µg/ml) resuspendiert und etwa eine Minute gekocht. Durch erneute Zentrifugation (15 min, 12000 rpm [Sigma 202MK], 4°C) werden die genomische DNA sowie die denaturierten Proteine pelletiert und anschließend aus der Lösung entfernt. Die isolierte Plasmid- DNA kann durch Zugabe von 200 µl Isopropanol gefällt und durch erneute Zentrifugation (15 min, 12000 rpm [Sigma 202MK], 4°C) sedimentiert werden. Abschließend

wird das DNA- Pellet getrocknet und in 30 µl RNaseH (100 µg/ml) enthaltendem TE- Puffer aufgenommen.

### 3.1.9 Präparative Isolierung von Plasmid- DNA aus Bakterien (Maxipräparation)

Die sog. „Maxipräparation“ wird bei Volumina ab etwa 100 ml Bakteriensuspension durchgeführt. Sie dient ausschließlich der präparativen Aufbereitung großer Plasmidmengen aus bereits eindeutig charakterisierten Klonen. Die Maxipräparation wird mit dem Kit der Firma Macherey und Nagel nach entsprechender Anleitung durchgeführt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte über AK100 Säulen; die Plasmid-DNA kann dabei mit Hilfe des Elutionspuffers eluiert, mittels alkoholischer Fällung präzipitiert und in TE-Puffer aufgenommen werden. Die DNA-Endkonzentration wird durch photometrische Messung bestimmt .

### 3.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration erfolgt durch photometrische Messung. Diese beruht auf der Absorption von UV-Licht durch eine sich im Strahlengang befindliche Substanz proportional zu deren Konzentration. Die Messung der Nukleinsäuren-Konzentration erfolgt bei deren Absorptionsmaximum von etwa 260 nm.



## 3.2 Protein- Techniken

### 3.2.1 Herstellung von Proteinextrakten

#### 3.2.1.1 Zellaufschluss unter nativen Bedingungen

Zur Durchführung der GST- Pulldown Analyse müssen Proteine in ihrer nativen Tertiärstruktur vorliegen, um von spezifischen Antikörpern im Rahmen des Assay effizient erkannt bzw. um Protein-Interaktionen eingehen zu können.

Um weitgehend native Proteinextrakte aus eukaryotischen Zellen zu gewinnen, werden pelletierte Zellen mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in Lysispuffer oder Puffer K (100 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,5 mM MgCl; 1 mM CaCl; 0,5% NP40; 2mM Dithiothreitol; 20 µg/ml Aprotinin und 0,2 mM PMSF) aufgenommen. Zur Gewinnung nativer Zellextrakte aus Bakterien werden pelletierte Bakterien in GST- Kopplungspuffer low salt aufgenommen. Die Zelllyse und Fragmentierung zellulärer DNA erfolgt während einer 20-minütigen Inkubation auf Eis und anschließende Beschallung mit Ultraschall (Sonikator, output- level 7, 20 s). Alle unlöslichen Faktoren werden mittels Zentrifugation (30 min, 12000 rpm [Sigma 202MK], 4°C) sedimentiert und die im Überstand befindlichen Proteinextrakte zur Durchführung des GST-Pulldown verwendet.

#### 3.2.1.2 Zellaufschluss unter reduzierenden Bedingungen

Zur Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE werden die Zellpellets in 2fach Probenpuffer resuspendiert, 10 sec beschallt und weitere 10 min gekocht. Nach anschließender Zentrifugation (30 min, 12000 rpm [Sigma 202MK], 4°C) befinden sich die löslichen Proteine im Überstand. Die Verwendung eines Detergenzien enthaltenden Puffers verbessert die Auftrennung der Proteine im Gel, da bei fehlender Tertiärstruktur die Wanderungsstrecke der Proteine im Gel direkt proportional dem Molekulargewicht ist (s. Kap. 3.2.2.1).

### 3.2.1.3 Proteinsynthese durch *in-vitro* Transkription /Translation

Zur *in-vitro* Synthese von Proteinen wird das gekoppelte Transkriptions/Translationssystem auf der Basis eines Kaninchen-Retikulozyten-Lysates der Firma Promega nach den Angaben des Herstellers verwendet. Als *template*-DNA dienen in dieser Arbeit ausschließlich Derivate des pSG5-Plasmides mit einem T7-Promotorelement. Da die Proteine zur GST-Pulldown Analyse radioaktiv markiert werden, werden im Rahmen der *in-vitro* Translation radioaktive Aminosäuren ( $^{35}\text{S}$ -Methionin;  $^{35}\text{S}$ -Cystein der Firma ICN) eingesetzt.

### 3.2.2. Techniken zum Nachweis von Proteinen

#### 3.2.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970; Maniatis et al., 1989)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine in Abhängigkeit des Molekulargewichtes elektrophoretisch aufgetrennt. Das im Gel und dem Probenpuffer enthaltene Sodiumdodecylsulfat (SDS) ermöglicht eine Auftrennung unabhängig von der Eigenladung der Proteine. Die Wanderungstrecke der Proteine im Gel ist unter diesen Bedingungen direkt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes. Ein Polyacrylamidgel besteht aus Acrylamid (AA) und dem quervernetzenden N,N` Methylenbis-acrylamid (BIS). Die Konzentration beider Bestandteile bestimmt die Porengröße des Gels und damit die Auftrennungskapazität. Die Polymerisation wird durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) gestartet und durch Tetramethylethyldiamid (TEMED) katalysiert. Um eine optimale Auftrennung der einzelnen Proteine zu erreichen, wird eine diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt. Am Übergang zwischen dem grobmaschigen, oberen Sammelgel („Uppergel“) und dem engporigen Trenngel („Bottomgel“) erfolgt die Konzentrierung der Proteine. In dieser Arbeit werden konstant 10-12.5%ige Polyacrylamidgele, sowie Gradientengele mit ansteigenden PAA- Konzentration von 10 bis 15% verwendet. Zur Herstellung von Gradientengelen werden beide PAA-

Konzentrationen in einem Gradientenmischer während des Gießens vermischt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in SDS-Laufpuffer bei einer angelegten Stromstärke von 25 mA innerhalb von 2- 3 h. Die Bestimmung der Proteinmasse ist durch den Vergleich der relativen Laufstrecke der Proteine mit der Laufstrecke des parallel mitgeführten Markerproteins mit bekannten Molekulargewicht möglich.

Trenngel: 375 mM Tris-HCl pH8,8; 0,1% SDS; 0,235% TEMED; 0,05% APS; AA und BIS variierten abhängig vom erforderlichen Trennbereich

Sammelgel: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,025% TEMED; 0,03% APS; 4% AA; 0,12% BIS

#### 3.2.2.2 Immunoblot (Western-Blot)

(Towbin et al., 1979; Burnette, 1981)

Bei einem Western-Blot werden die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine über kovalente Wechselwirkungen an eine Polyvinylidendifluorid-Membran (Immobilon, Millipore) gebunden und mit spezifischen Antikörpern immunologisch detektiert. Vor dem Proteintransfer wird die Membran durch 10-minütiges Inkubieren in Methanol polarisiert, um eine Abstoßungsreaktion der Membranoberfläche mit dem Transferpuffer zu vermeiden. Der Transfer der Proteine erfolgt nach dem Tank-Blot Verfahren in SDS-Transferpuffer innerhalb von 2 h bei 30 V oder alternativ über Nacht bei 10 V. Anschließend wird die Markerspur von der restlichen Membran abgetrennt, in Amidoschwarzlösung (0,1% Amidoschwarz (w/v) in 25% Isopropanol (v/v) und 10% Eisessig (v/v)) gefärbt und in Entfärbelösung (10% Isopropanol (v/v), 10% Eisessig (v/v)) entfärbt. Die restliche Membran wird vor der weiteren Verwendung zunächst in Methanol, anschließend in Wasser angefeuchtet und mit Blocking-Reagenz (10% Magermilchpulver (v/w) in PBS) für 30 min inkubiert. Durch das Abblocken freier Membranbereiche mit Proteinen aus der Milch wird eine unspezifische Bindung der Antikörper an die polare Membran verhindert. Die Membran wird mit 10 ml einer Erst-Antikörperlösung überschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Durch mehrfaches Waschen

in PBS-Puffer werden die nicht gebundenen Antikörper entfernt. Die selbe Membran wird mit 10 ml einer entsprechenden Zweitantikörperlösung 1h bei 4°C erneut inkubiert und alle ungebundenen Immunglobuline durch Waschen mit PBS-Puffer entfernt. Der Nachweis der membrangebundenen Zweitantikörper erfolgt mit Hilfe der ECL-Reaktion. Die ECL-Reaktion (*Enhanced Chemiluminescence Reaction*) beruht auf der Detektion von Lichtstrahlen, die bei der enzymatischen Umwandlung des Substrates Luminol, in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxydase freigesetzt werden. Die hierbei emittierte Strahlung wird auf einem Röntgenfilm nachgewiesen. Der ECL-Nachweis, die Entwicklung des Röntgenfilmes und dessen Fixierung wurde mit dem *ECL-Western-Blotting* Kit der Firma Amersham nach deren Angaben vorgenommen.

#### 3.2.2.3 Unspezifischer Nachweis von Proteinen im SDS-Gel

Proteine lassen sich durch den Farbstoff Coomassie-Blue anfärben. Zur Induktionskontrolle der Expression der GST-Fusionsproteine werden die SDS-Gele eine Stunde bei 55°C in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Anschließend wird der Gelhintergrund durch 3x 10-minütiges Aufkochen in Wasser wieder entfärbt. Die gefärbten Gele werden im Vakuum durch Hitzeeinwirkung getrocknet.

#### 3.2.2.4 Nachweis radioaktiv-markierter Proteine durch Autoradiographie

Um <sup>35</sup>S-markierte Proteine in SDS-Gelen nachzuweisen, werden diese 30 min fixiert (50% Methanol (v/v), 10% Eisessig (v/v)), 3x in H<sub>2</sub>O gewaschen, 1 Stunde in 1M Natriumsalicylatlösung inkubiert und anschließend im Vakuum durch Hitzeeinwirkung getrocknet und zur Belichtung eines Röntgenfilms eingesetzt.

### 3.2.3 Techniken zum Nachweis der subzellulären Proteinlokalisierung

#### 3.2.3.1 Detektion autofluoreszierender Proteine durch Fluoreszenzmikroskopie

Die Autofluoreszenz ermöglicht die Lokalisation eines fluoreszierenden, rekombinanten Fusionsproteins innerhalb einer Zelle nach spezifischer Anregung im UV-Licht. Zur Durchführung dieses Assay werden adhärente Zellen auf sterile Deckgläschen ausgesät, welche am nächsten Tag mit Derivaten des pEGFP-C1 oder pDsRed-C1 Vektors bzw. den parentalen Vektoren unter Verwendung des FuGENE 6 Reagenz (s. Kap. 3.5.3.1) transfiziert werden. 24- 48 Stunden nach Transfektion werden die Zellen 2 x mit 1 ml PBS-Puffer gespült und zum Fixieren mit 1 ml Paraformaldehyd (4% v/v in PBS) für 15 min bei 37°C überschichtet, welches anschließend durch Spülen mit PBS-Puffer wieder entfernt wird. Die Zellen werden zur Färbung 1 Minute lang in DAPI- Lösung (0,2 µg/ml in Methanol) inkubiert, mit Methanol gespült und kopfüber auf einen Objektträger in Elvanol eingebettet. Die Auswertung erfolgt an einem Fluoreszenz- Mikroskop.

#### 3.2.3.2 Anfärben von zellulärer DNA mit dem DAPI- Reagenz

Das DAPI- Reagenz (4,6-Diamidino-2-Phenylindol, Sigma) ist ein blau fluoreszierender Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert und daher ausschließlich Zellkerne anfärbt. Durch den Vergleich der in der DAPI-Färbung sichtbaren Kerne mit den durch Fluoreszenz sichtbar gemachten Fusionsproteinen, kann eine Aussage über die Lokalisation der relevanten Proteine innerhalb der Zelle getroffen werden.

### 3.2.4 Methoden zum Nachweis von Protein- Interaktionen

#### 3.2.4.1 GST-Pulldown Analysen

Mit Hilfe der GST-(Glutathion S-Transferase) Pulldown Analyse kann eine spezifische Bindung zweier Proteine *in-vitro* nachgewiesen werden. Bei dieser Methode wird eines der zu untersuchenden Proteine bakteriell als GST-Fusionsprotein exprimiert. Hierzu werden *E.coli*-BL21-DE3 Bakterien mit pGEX- abgeleiteten Konstrukten transformiert und in 20 ml LB-Amp - Medium über Nacht angezogen. Am darauffolgenden Tag werden 200 ml LB-Amp-Medium mit 4 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,6 wird durch Zugabe von IPTG (0,1mM) die Proteinexpression induziert. Nach Kultivierung für weitere 4 Stunden wird ein Teil der Bakterien in 2x Probenpuffer aufgenommen und die Protein-Induktion nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Extrakte durch Färbung mit Coomassie-Blau Lösung kontrolliert. Der verbleibende Teil der Übernachtskultur wird in Lysispuffer (10 mM Tris/HCL, pH 8,0; 0,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 1mM DTT; 0,1 mM PMSF) aufgenommen, aliquotiert und bei -70 °C eingefroren. Das native Zelllysat wird jeweils frisch aufgetaut, 30 min zentrifugiert (12000 rpm [Sigma 202MK], 4°C) und je 200 µl des Überstandes mit je 40 µl Glutathion- Sepharose (1:2 in PBS, Boehringer) versetzt und 4 Stunden bei 4°C auf einem Überkopf-Rotator inkubiert. Das GST-Fusionsprodukt wird hierbei durch die Bindung des GST- Anteils an die Glutathion-S- Sepharose -Matrix immobilisiert und durch 4-maliges Waschen mit je 500 µl GST-low-salt- Kopplungspuffer (1 min, 4000 rpm [Sigma 202MK], 4C°) aufgereinigt. Nach Zugabe von 10 µl eines *in-vitro* transkribierten/translatierten radiomarkierten Proteins können beide Proteine über Nacht komplexieren. Die Glutathion- Sepharose wird daraufhin 4 mal mit 500 µl GST-high-salt Kopplungspuffer gewaschen (2 min, 4000 rpm [Sigma 202MK], 4°C). Nach vollständiger Entfernung des Puffers werden 20 µl 2x Probenpuffer zugeben, um die Proteine durch 10-minütiges Kochen von der Sepharose-Matrix zu lösen. Nach kurzer Zentrifugation können die Proteine

dem Überstand entnommen, in einer SDS-PAGE (3.2.2.1) aufgetrennt und mittels Autoradiographie (3.2.3.1) nachgewiesen werden.

#### 3.2.4.2 Kolokalisations-Assay

Das Kolokalisations-Assay mit der unter 3.2.3.1 beschriebenen Methode ermöglicht einen Hinweis auf eine Interaktionen zweier Proteine *in-vivo*. Hierzu werden beide auf Interaktion zu testenden Proteine rekombinant als Fusionsprodukte des grün-fluoreszierenden Konstruktes pEGFP-C1 bzw. des rot-fluoreszierenden Konstruktes pDsRed-C1 mit unterschiedlichen Fluorochromen exprimiert und deren Lokalisation innerhalb der Zelle mittels Autofluoreszenz detektiert. Hinweise auf eine gemeinsame zelluläre Lokalisation erfolgen nach separater Dokumentation beider Proteine und anschließender Überlagerung der Bilder durch digitale Bildbearbeitung. Übereinander liegende Signale werden durch entsprechende Bildbearbeitungssysteme als gelbe Bereiche dargestellt und können als Orte adäquater zellulärer Lokalisation gedeutet werden.

### 3.3 Zellkultur- Techniken

#### 3.3.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

(Maniatis et al.,1989)

Suspensionskulturen von *E.coli* werden in LB-Medium kultiviert. Zur selektiven Amplifikation transformierter Bakterien wird dem Medium das Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml Medium) bzw. Kanamycin (30 µg/ml Medium) zugesetzt, wodurch selektive Wachstumsbedingungen in Abhängigkeit plasmidgebundenen Resistenzgene erzeugt werden. Das Wachstum erfolgt unter aeroben Bedingungen bei 37°C als Übernachtskultur auf einem Schüttler. Zur permanenten Lagerung der Bakterien werden die Bakteriensuspensionen mit 20% DMSO (v/v) versetzt und bei -70 °C tiefgefroren.

### 3.3.2 Kultivierung und Lagerung immortalisierter Säugerzelllinien

Die Inkubation der Zellkulturen erfolgt bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre. Adhärente Zellen werden durch Behandlung mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturf Flasche gelöst und zur Passagierung in frisches Kulturmedium der Firma PAA überführt.

## 3.4 Transformation von Zellen

### 3.4.1 Transformation von Bakterienzellen

(Kushner et al., 1978; Lederberg und Cohen, 1974)

Zur Transformation werden „kompetente Bakterien“ eingesetzt. Als „kompetent“ bezeichnet man solche Bakterien, die eine erhöhte Fähigkeit, Fremd-DNA durch Transformation aufzunehmen, besitzen. Zu ihrer Herstellung sind 30 ml SOB-Medium (20 g/l Trypton; 5 g/l Yeast-Extract; 0,6 g/l NaCl; 0,5 g/l KCl; zuzüglich 10 ml einer 2M Mg<sup>2+</sup>-Stammlösung (203,3 g/l MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O; 246,5 g/l MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O) frisch zugegeben), mit dem jeweiligen Bakterienstamm inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert worden. 8 ml aus der Übernachtskultur werden entnommen und in 200 ml frisches SOB-Medium überführt. Die weitere Kultivierung erfolgt bis zu einer optischen Dichte von etwa 0.3 bei einer Wellenlänge von 550 nm. Nach Aliquotierung auf 4 Teile à 50 ml und Inkubation für 15 min auf Eis, wurden diese bei 4°C und 4000 rpm [Heraeus, Megafuge1.0] abzentrifugiert. Nach Resuspension der pelletierten Bakterien in je 16 ml Transformationspuffer 1 (0,1 M RbCl; 0,05 M MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O; 0,03 M CH<sub>3</sub>COOK pH 7,5; 0.01 M CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; 15% Glycerol (v/v)) , und wiederholte Lagerung für 15 min auf Eis, werden die Bakterien unter den bereits erwähnten Bedingungen zentrifugiert. Die Pellets werden in je 4 ml Transformationspuffer 2 (0,5 M MOPS pH 6,8; 0.01 M RbCl; 0,075 M CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; 15% Glycerol (v/v)) aufgenommen, à 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung der



kompetenten Stämme erfolgte bei -70°C. Zur Transformation wurden 50 µl eines solchen Stammes aufgetaut und mit 1-10 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Auf diese Weise lagert sich die negativ geladene DNA spontan an die Zellwand der Bakterien an. Die 1-minütige Hitzeschockbehandlung in dem auf 42°C temperierten Wasserbad führt zu einer temporären Permeabilitätserhöhung der Zellmembran, wodurch die Translokation der DNA in das Zellinnere ermöglicht wird. Die Kultivierung erfolgt in LB-Medium unter Zugabe eines adäquaten Selektionsmarkers nach mehrminütiger Regeneration der Zellen auf Eis.

### 3.4.2 Transfektion von Säugerzellen

#### 3.4.2.1 Transfektion mit FuGENE-6

Die Transfektion der adhärenenten, eukaryotischen Zellen wird mit Hilfe des FuGENE-6 Reagenz der Firma Roche nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Optimale Transfektionsbedingungen bezüglich des Verhältnis von DNA zu FuGENE Reagenz wurden im Vorfeld ausgetestet. Bei optimalen Bedingungen werden Transfektionsraten von zirka 80% erreicht.

## 3.5 Klonierung der HtrA2

### 3.5.1 Amplifikation der Fragmente *HtrA2-N*, *HtrA2-MI* und *HtrA2-C*

Die Amplifikation des N-Terminus der HtrA2 (*HtrA2-N*) erfolgt mit Hilfe der Primer *Serfor-2* und *SerSphrev* und umfaßt eine Basenlänge von ca. 200 bp. Das mittlere Fragment (*HtrA2-MI*) wurde mittels der Primer *SerSphfor* und *SerBamrev* amplifiziert und ist ca. 480 bp lang. Die Amplifikation des C-Terminus der HtrA2 (*HtrA2-C*) wurde mit Hilfe der Primer *SerBamfor* und *SerGesrev* amplifiziert und besitzt eine Länge von ca. 750 bp.

### 3.6 Klonierung der HtrA2 in pEGFP-C1 und pDsRed-C1

#### 3.6.1 Klonierung der HtrA2frag in pEGFP-C1 und pDsRed-C1

Zur Klonierung des mittleren Fragment HtrA2frag (ca. 800bp) in die beiden Vektoren pEGFP-C1 und pDsRed-C1 wird das Insert HtrA2frag zunächst durch PCR mit Hilfe des template pSG5HA+HtrA2frag und den Primern *SerEGFPEcofor* und *SerBglrev* amplifiziert (siehe Abb. 7). Der nachfolgende Restriktionsverdau erfolgt durch die Enzyme *EcoRI* und *BglII*.

Durch anschließende Ligation in die beiden Vektoren pEGFP-C1 und pDsRed-C1 entstehen die Konstrukte pEGFP-C1+HtrA2frag und pDsRed-C1+HtrA2frag. Mit Hilfe dieser Konstrukte kann das mittlere Fragment der HtrA2 als grün- bzw. rotfluoreszierendes Fusionsprotein in eukaryoten Zellen exprimiert werden. Zur Ligation wurden sowohl der Vektor pEGFP-C1, als auch der Vektor pDsRed-C1 mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* geöffnet.

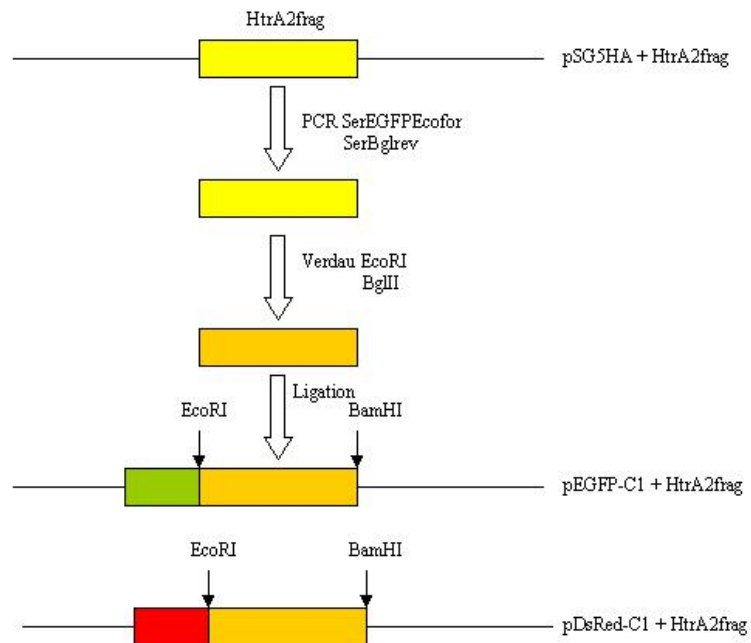


Abbildung 7: Klonierung der HtrA2frag (ca. 800bp) aus dem Vektor pSG5HA+HtrA2frag durch PCR und Restriktionsverdau in die Vektoren pEGFP-C1 und pDsRed-C1.

### 3.6.2 Klonierung der HtrA2ges in pEGFP-C1 und pDsRed-C1

Das Insert HtrA2ges (ca. 1400bp) wird durch PCR mit Hilfe des Konstruktes pUC18+HtrA2ges als template und den Primern *SerSacfor* und *SerKpnrev* amplifiziert. Der Restriktionsverdau erfolgt durch die Enzyme *SacI* und *KpnI*. Durch Ligation in die Vektoren pEGFP-C1 und pDsRed-C1 entstehen die Konstrukte pEGFP-C1+HtrA2ges und pDsRed-C1+HtrA2ges.

Mit Hilfe dieser Konstrukte kann die HtrA2ges (gesamte HtrA2) als grün- bzw. rotfluoreszierendes Fusionsprotein in eukaryoten Zellen exprimiert werden. Sowohl der Vektor pEGFP-C1, als auch der Vektor pDsRed-C1 wurden mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *KpnI* geöffnet (siehe Abb. 8).

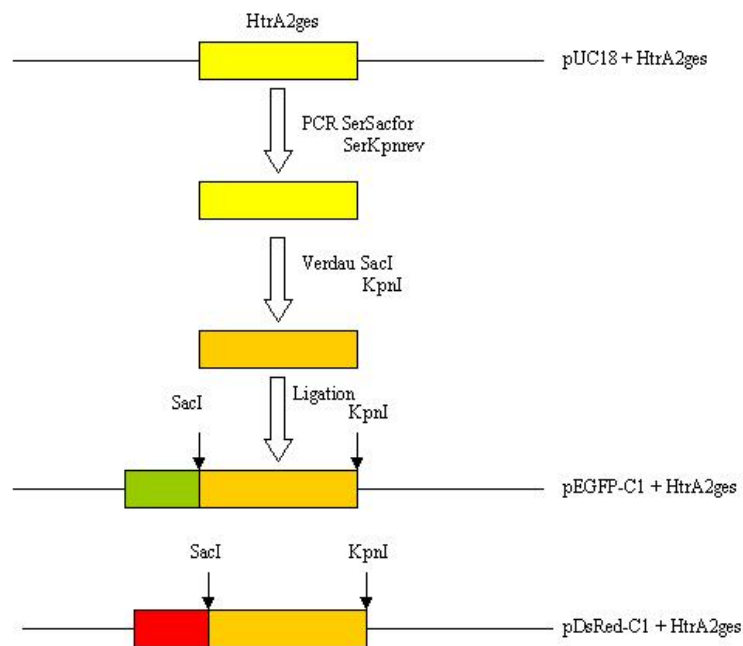


Abbildung 8 : Klonierung der HtrA2ges aus dem Vektor pUC18+HtrA2ges durch PCR und Restriktionsverdau in die Vektoren pEGFP-C1 und pDsRed-C1.

### 3.7 Klonierung der HtrA2 in pGEX

#### 3.7.1 Klonierung der HtrA2frag in pGEX

Zur Klonierung der HtrA2frag (mittlere Fragment der HtrA2) in pGEX wird das Insert zunächst mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *EcoRI* und *XhoI* aus dem Hefekonstrukt pJG46L+HtrA2frag geschnitten. Zur Ligation in den Vektor pGEX wird dieser mit den gleichen Enzymen verdaut, so daß in die auf diese Weise erzeugten Schnittstellen das Insert spezifisch ligiert werden kann (Abb. 9). Mit Hilfe dieses Konstruktes kann die HtrA2frag als Bestandteil eines Fusionsprotein aus der HtrA2frag und der Glutathion-S-Transferase in Bakterien exprimiert werden.

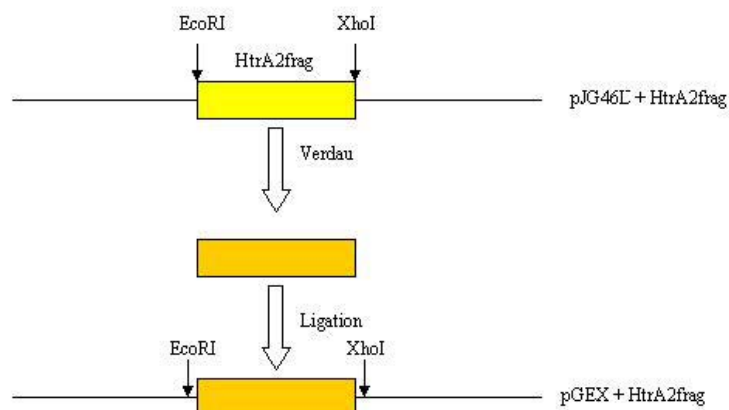


Abbildung 9: Klonierung der HtrA2frag (ca. 800bp) aus dem Konstrukt pJG46L+HtrA2frag nach Restriktionsverdau in den Vektor pGEX .

### 3.7.2 Klonierung der HtrA2ges in pGEX

Zur Klonierung der HtrA2ges (gesamte HtrA2) in den Vektor pGEX wird das Insert HtrA2ges zunächst durch PCR mit Hilfe des Konstruktes pUC18+HtrA2ges (vgl. Kap. 4.1) und den Primern *SerGesBglfor* und *SerGesBglrev* amplifiziert (Abb.10). Der nachfolgende Restriktionsverdau erfolgt durch das Enzym *Bgl*II.

Durch Ligation in den Vektor pGEX entsteht der Fusionsvektor pGEX+HtrA2ges. Zur Ligation wurde der Vektor pGEX mit Hilfe des Restriktionsenzym *Bam*HI geöffnet. Mit Hilfe dieses Konstruktes kann die HtrA2ges als Bestandteil eines Fusionsprotein aus der HtrA2frag und der Glutathion-S-Transferase in Bakterien exprimiert werden.

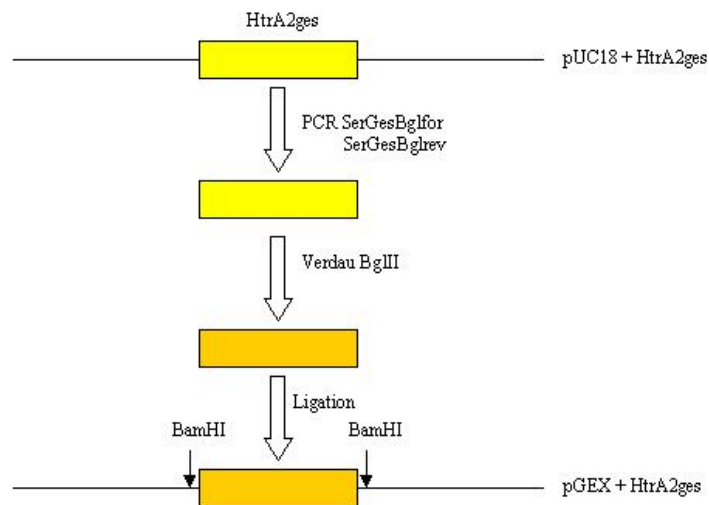


Abbildung10: Klonierung der HtrA2ges aus dem Konstrukt pUC18+HtrA2ges durch PCR und Restriktionsverdau in den Vektor pGEX.

### 3.8 Klonierung der HtrA2 in pSG5 bzw.pSG5HA

#### 3.8.1 Klonierung der HtrA2frag in pSG5HA

Um HtrA2frag als Fusionsprotein mit einem „HA-Tag“ zu exprimieren, wird HtrA2frag in den Vektor pSG5HA kloniert. Das HA-Tag ermöglicht eine Detektion des HtrA2-Fragmentes im Western-blot mit Hilfe spezifischer HA-gerichteter Antikörper. Zu Beginn der Dissertationsarbeit liegt der Vektor pSG5HA als ein Konstrukt pSG5HA+CB vor und enthält das CB-Fragment unter spezifischer Expressionskontrolle (Dissertation U. Galli, 2004). Der Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *BamHI* ermöglicht die gezielte Entfernung von CB und eine spezifische Ligation der HtrA2frag. Dieses wird mittels *EcoRI* und *BamHI* in einem vorausgehenden Schritt aus dem Konstrukt pJG46L-HtrA2frag entfernt. Abb.11 verdeutlicht schematisch die beschriebene Vorgehensweise. Das Konstrukt pSG5HA+HtrA2frag wird zur *in-vitro* Transkription/Translation der HtrA2frag im Rahmen des GST-Pulldown eingesetzt.

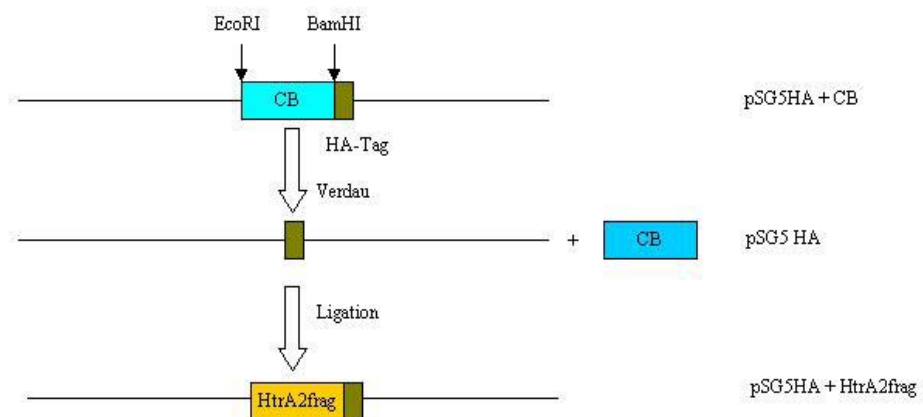


Abbildung 11: Klonierung der HtrA2frag in das Konstrukt pSG5HA+CB nach Restriktionsverdau und Entfernung des „CB“ -Fragmentes und Entstehung des Konstruktes pSG5HA+HtrA2frag.

### 3.8.2 Klonierung der HtrA2ges in pSG5

Zur Klonierung der HtrA2ges (gesamte HtrA2) in den Vektor pSG5 wird das Insert HtrA2ges zunächst durch PCR mit Hilfe des Konstruktes pUC18+HtrA2ges und den Primern *SerGesBglfor* und *SerGesBglrev* amplifiziert (Abb.12). Der nachfolgende Restriktionsverdau erfolgt durch das Enzym *Bgl*II.

Durch Ligation in den Vektor pSG5 entsteht das Konstrukt pSG5+HtrA2ges. Zur Ligation wurde der Vektor pSG5 mit Hilfe des Restriktionsenzym *Bgl*II geöffnet. Das Konstrukt pSG5HA+HtrA2ges wird zur *in-vitro* Transkription/Translation der HtrA2ges im Rahmen des GST-Pulldown eingesetzt.

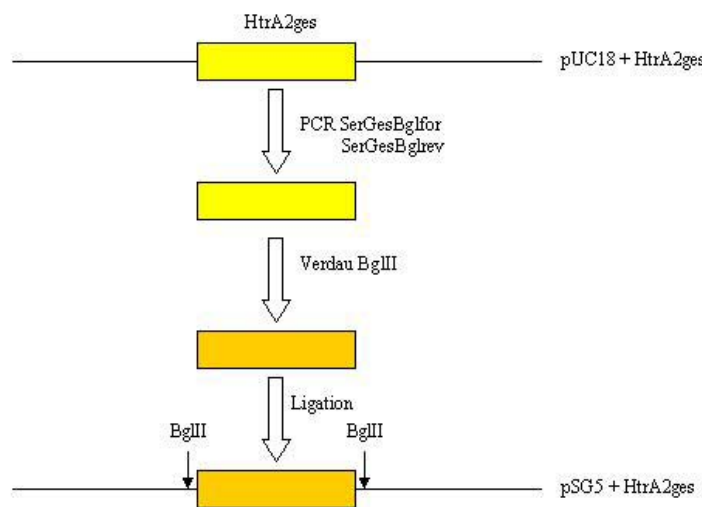


Abbildung 12: Klonierung der HtrA2ges aus dem Konstrukt pUC18+HtrA2ges durch PCR und Restriktionsverdau in den Vektor pSG5.

## 4 Ergebnisse

Im menschlichen Genom lassen sich zahlreiche Vertreter endogener Retroviren nachweisen. HERV-K ist jedoch der einzige Vertreter mit offenem Leserahmen für die Gene *gag*, *pol* und *env*; *np9* ist dabei nachweislich ein Spleißprodukt aus dem *env*- Leserahmen von HERV-K (Armbruster et al., 2002). Die Expression von Np9 erfolgt ausschließlich in tumorös entartetem Gewebe und transformierten Zellen, nicht aber in normalen Zellen.

Mit Hilfe des Hefe-II-Hybrid Systems konnte die HtrA2, eine Serin-Protease, (Accession Nr.: AF141305) als ein Interaktionspartner von Np9 identifiziert werden (Armbruster et al., 2002). Bei dem im Hefesystem identifizierten Klon handelt es sich jedoch um einen unvollständigen Klon, dessen fehlende N- und C- terminale Sequenzen zunächst vervollständigt werden müssen. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit soll schwerpunktmässig die Interaktion zwischen Np9 und der HtrA2 mit Hilfe eines Kolokalisations-Assays näher charakterisiert und eine spezifische Bindung beider Proteine durch eine GST-Pulldown-Analyse verifiziert werden.

### 4.1 Klonierung der HtrA2

#### 4.1.1 Amplifikation der Fragmente *HtrA2-N*, *HtrA2-MI* und *HtrA2-C*

Aus der humanen Testis cDNA- Bank wurde mit Hilfe der PCR die HtrA2 kloniert. Eine zusammenhängende Amplifikation der gesamten HtrA2 (*HtrA2ges*) mit einer Länge von ca. 1400 bp war experimentell nicht möglich. Es wurden stattdessen zunächst drei Fragmente der HtrA2 amplifiziert (*HtrA2-N*, *HtrA2-MI*, *HtrA2-C*). Die Amplifikation erfolgte über natürlicherweise im Gen vorkommende Restriktionsschnittstellen um keine Sequenzänderung des Gens vornehmen zu müssen (vgl. Kap. 3.5).



#### 4.1.2 Ligation der Fragmente in den Vektor pUC18

Die Ligation der drei Teilfragmente der HtrA2 erfolgt sequentiell in den Vektor pUC18 (vgl. Abb. 13).

Primär erfolgt eine Amplifikation der etwa 200 bp umfassenden HtrA2-N aus dem PCR-template *HtrA2-N* mit Hilfe der Primer *SerHind3for* und *SerSphrev*, welche die Erkennungssequenzen für die Restriktionsschnittstellen enthalten. Die so erzeugten Amplifikate werden durch die Enzyme *Hind3* und *SphI* verdaut. Zur Ligation in pUC18 wird dieser Vektor entsprechend mit *Hind3* und *SphI* geöffnet und mit dem Fragment HtrA2-N ligiert. Es entsteht das Plasmid pUC18 + HtrA2-N.

Das PCR-template *HtrA2-MI* wurde in unveränderter Form in pGEM kloniert. Mit Hilfe der Enzyme *SphI* und *BamHI* wurde das Fragment HtrA2-MI, welches ca. 480 bp umfaßt, aus dem Vektor pGEM+HtrA2-MI geschnitten und in das Konstrukt pUC18+HtrA2-N ligiert. Das Plasmid pUC18+HtrA2-N wurde mittels *SphI* und *BamHI* linearisiert. Durch Ligation entsteht das um HtrA2-MI erweiterte Konstrukt pUC18+HtrA2-N+HtrA2-MI.

*HtrA2-C* wurde ebenfalls als PCR-template in unveränderter Form in den Vektor pGEM kloniert. Das annähernd 750bp große HtrA2-C Fragment wurde mit Hilfe der Enzyme *KpnI* und *BamHI* aus pGEM+HtrA2-C geschnitten und nach Linearisierung des Konstruktes pUC18+HtrA2-N+HtrA2-MI mittels *KpnI* und *BamHI* kloniert.

Durch Ligation der HtrA2-C wurde die Klonierung der gesamten Serin-Protease (HtrA2ges) aus insgesamt drei Teilfragmenten (pUC18+HtrA2-N+HtrA2-MI+HtrA2-C) erfolgreich abgeschlossen.

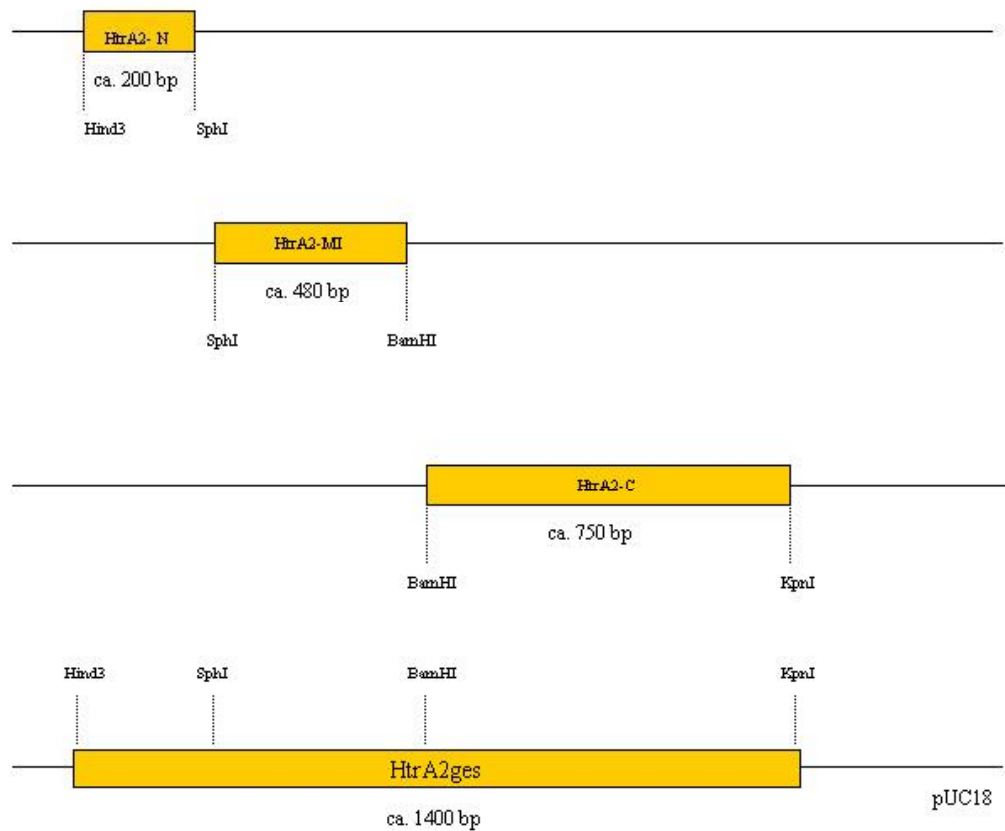


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Klonierung der HtrA2 (HtrA2ges) in pUC18. Die Klonierung der vollständigen HtrA2 (HtrA2ges) aus drei Teilfragmenten erfolgt sequentiell in den Vektor pUC18 in der dargestellten Reihenfolge. Der Restriktionsverdau der einzelnen Fragmente erfolgt mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Hind3* und *SphI* für HtrA2-N, *SphI* und *BamHI* für HtrA2-MI bzw. *BamHI* und *KpnI* für HtrA2-C.

## 4.2 Zelllokalisations-Assay

Zum Nachweis der zellulären Lokalisation der HtrA2, als auch einer möglichen Interaktion zwischen Np9 und HtrA2 im Rahmen eines Kolokalisations-Assays, wurde die HtrA2 sowohl in den Vektor pEGFP-C1, als auch in den Vektor pDsRed-C1 kloniert (vgl. Kap. 3.6). Diese Konstrukte kodieren Fusionsproteine aus einem Fluorochrom und der HtrA2. Die Expression der Fusionsproteine erfolgt nach Transfektion der Konstrukte in Cos-1 Zellen. Die

zelluläre Lokalisation der HtrA2 kann durch den rot- bzw. grün-fluoreszierenden Anteil des Fusionsproteins im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Durch den Vergleich des Verteilungsmusters der HtrA2 in einfach und mit Np9- kotransfizierten Zellen soll ein Hinweis auf eine Interaktion beider Proteine erzielt werden.

Das Lokalisations-Assay wurde sowohl mit dem primär aus dem Hefe-II-Hybrid System identifizierten unvollständigen HtrA2 Fragment (HtrA2frag), als auch dem Volllängenklon (HtrA2ges) durchgeführt. Das Verteilungsmuster der HtrA2 wird insbesondere im Hinblick auf mögliche Unterschiede in einfach und mit Np9-kotransfizierten Zellen analysiert.

#### 4.2.1 Transfektion von Cos-1 Zellen durch HtrA2frag

Die Transfektion von Cos-1 Zellen erfolgt durch das Konstrukt pEGFP-C1+HtrA2frag. Durch *in-vivo* Expression entsteht ein grün-fluoreszierendes Protein, welches HtrA2frag als Fusionsteil beinhaltet. Im Falle der HtrA2frag fehlen diesem jedoch sowohl ein Teil der N-terminalen als auch die gesamte C-terminale Proteindomäne.

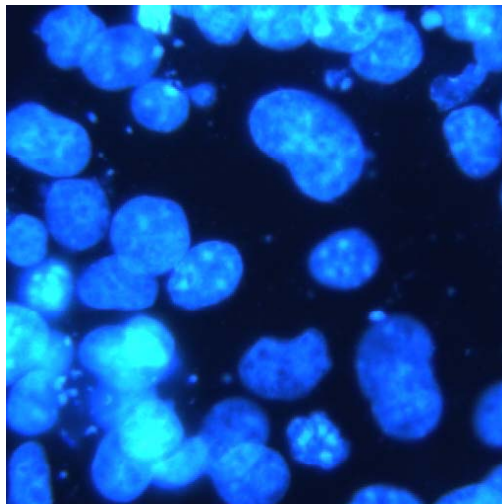


Bild 1

DAPI- gefärbte Cos-1 Zellkerne  
nach Transfektion mit  
pEGFP-C1+HtrA2frag

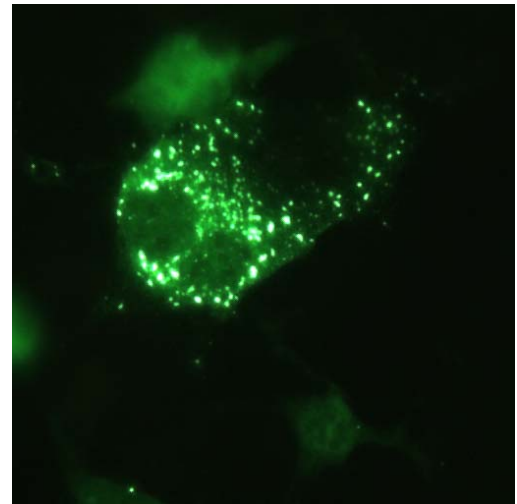


Bild 2

Expression der HtrA2frag  
nach Transfektion der Cos-1 Zellen  
mit pEGFP-C1+HtrA2frag

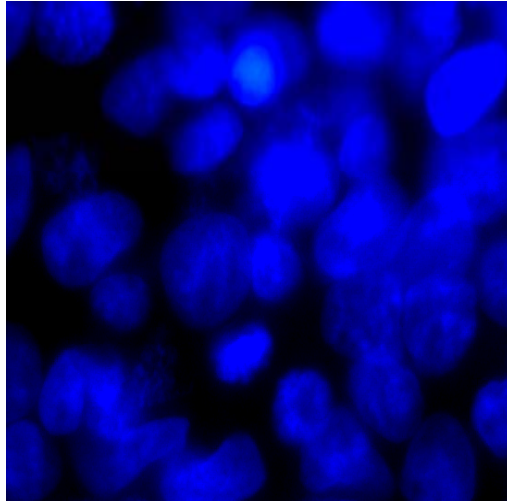


Bild 3

DAPI- gefärbte Cos-1 Zellkerne  
nach Transfektion mit  
pEGFP-C1

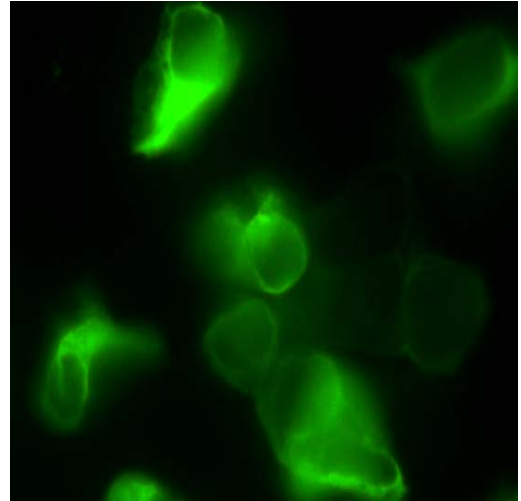


Bild 4

Expression des EGFP-C1 Proteins  
nach Transfektion der Cos-1 Zellen  
mit pEGFP-C1

Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der subzellulären Lokalisation des rekombinant exprimierten HtrA2frag-Proteins in Cos-1 Zellen.

Ein Vergleich DAPI- gefärbter Zellkerne mit dem durch Fluoreszenz sichtbar gemachten HtrA2frag-Fusionsprotein ermöglicht die Lokalisation des Fusionsproteins in unterschiedlichen Zellkompartimenten.

Die Verteilung der HtrA2frag erfolgt ausschließlich im Cytoplasma der Zelle (vgl. Bild 2, Abb. 15). Eine Lokalisation der HtrA2frag im Zellkern ist nicht nachweisbar. Das Verteilungsmuster der HtrA2frag im Cytoplasma besitzt die Form kleinkörniger Konglomerate.

Im Gegensatz zu HtrA2frag erfolgt die Verteilung des pEGFP-C1-Proteins diffus sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma der Zelle (vgl. Bild 4, Abb. 15).

#### 4.2.2 Transfektion von Cos-1 Zellen durch HtrA2ges

Die Transfektion der Cos-1 Zellen erfolgt durch das Konstrukt pEGFP-C1+HtrA2ges. Durch die *in-vivo* Expression entsteht ein grün-fluoreszierendes Fusionsprotein, welches die gesamte HtrA2 (HtrA2ges) als Teilprotein

beinhaltet. Im Vergleich zu HtrA2frag sind bei HtrA2ges sowohl die N- als auch die C- terminalen Proteindomänen vollständig vorhanden.

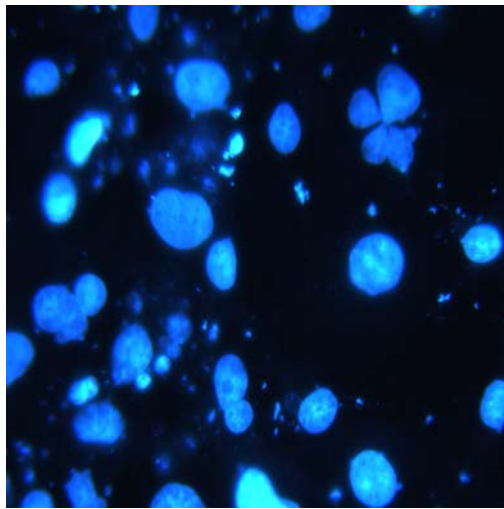


Bild 1

DAPI- gefärbte Cos-1 Zellkerne  
nach Transfektion mit  
pEGFP-C1+HtrA2ges

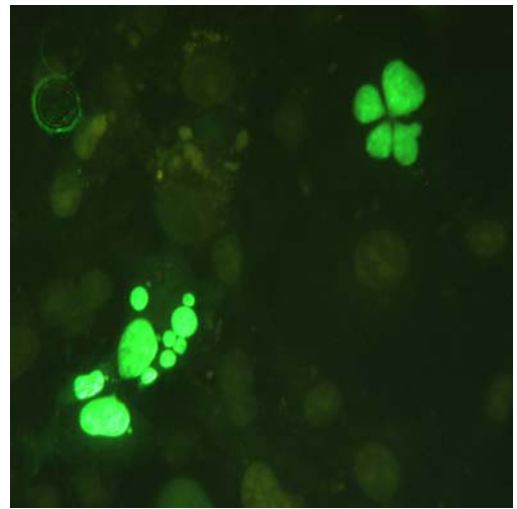


Bild 2

Expression der HtrA2ges  
nach Transfektion der Cos-1 Zellen  
mit pEGFP-C1+HtrA2ges

Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der subzellulären Lokalisation des rekombinant exprimierten HtrA2ges-Proteins in Cos-1 Zellen.

Es zeigt sich anhand von Abb.16, daß die Lokalisation der HtrA2ges ausschließlich im Zellkern in Form einer diffusen Verteilung vorliegt (vgl. Bild 2, Abb.16). Eine spezifische Verteilung innerhalb des Zellkerns ist nicht darstellbar. Im Gegensatz zu HtrA2frag ist eine Lokalisation im Cytoplasma der Zelle in Form kleinkörniger Konglomerate nicht nachweisbar (vgl. Bild 2, Abb.15).

#### 4.2.3 Kotransfektion von Cos-1 Zellen durch die HtrA2ges und Np9

Zur Charakterisierung einer möglichen Interaktion zwischen Np9 und der gesamten HtrA2-Protease (HtrA2ges) wurden die Cos-1 Zellen im Rahmen des Kolokalisations-Assay mit den Konstrukten pDsRed-C1+Np9 und pEGFP-C1+HtrA2ges doppelt transfiziert ( vgl. Abb. 17).

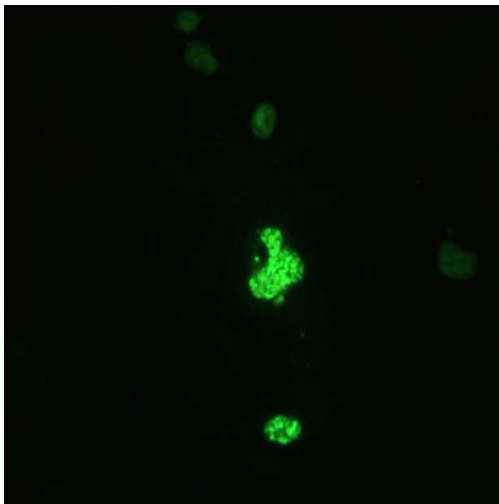


Bild 1

Expression der HtrA2ges  
nach Transfektion der Cos-1 Zellen mit  
pEGFP-C1+HtrA2ges

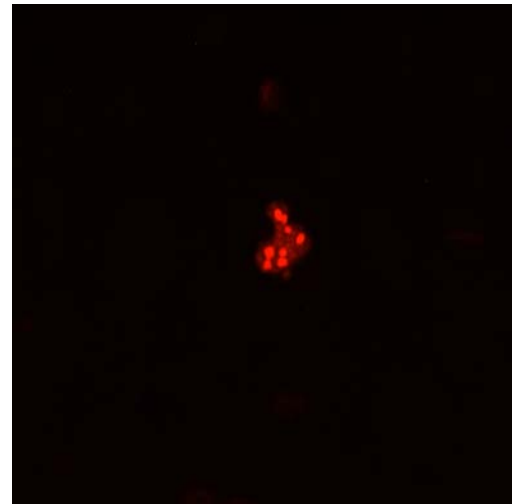


Bild 2

Expression von Np9  
nach Transfektion der Cos-1 Zellen mit  
pDsRed-C1+Np9

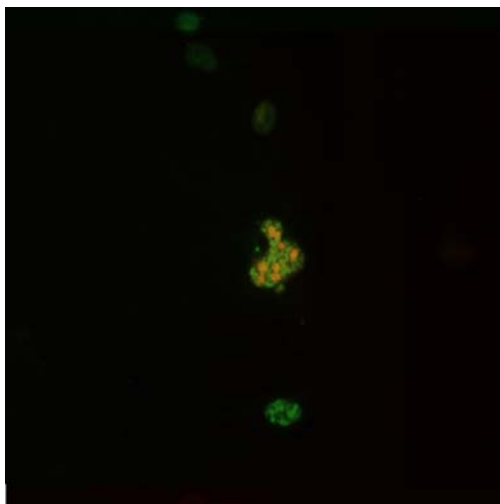


Bild 3

Überlagerung der rot- und grün-  
fluoreszierenden Fusionsproteine

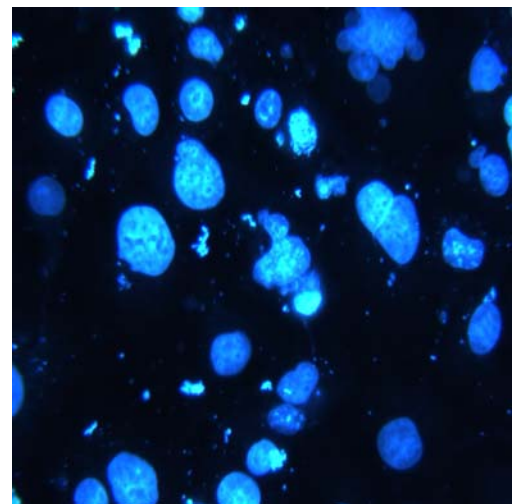


Bild 4

DAPI- gefärbte Cos-1 Zellkerne  
nach Ko-Transfektion mit  
pEGFPC1+HtrA2ges/pDsRedC1+Np9

Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der subzellulären Lokalisation des rekombinant exprimierten HtrA2ges- und Np9-Proteins in doppelt transfizierten Cos-1 Zellen.

Wie aus Abb. 17, Bild 1 hervorgeht, erfolgt die Lokalisation der HtrA2ges ausschließlich im Zellkern. Eine Lokalisation der HtrA2ges im Cytoplasma der Zelle ist nicht nachweisbar. Die Verteilungsform der HtrA2ges im Zellkern liegt diskret in Form kleinkörniger Konglomerate vor (vgl. Bild 1, Abb. 17). Eine diffuse Verteilung innerhalb des Zellkerns, wie für HtrA2ges-einfach transfizierte Zellen beschrieben, konnte in diesem Fall nicht nachgewiesen werden (vgl. Bild 2, Abb. 16).

Die Verteilung von Np9 liegt erwartungsgemäß im Zellkern und ist dort in subnukleären Strukturen lokalisiert (vgl. Bild 2, Abb. 17). Eine Lokalisation von Np9 in den Nukleoli des Zellkerns konnte durch Arbeiten von Armbrüster et al. im Jahre 2002 experimentell nachgewiesen werden.

Mit Hilfe einer computertechnischen Bildüberlagerung ist die Darstellung von Fluorochromen gleicher zellulärer Lokalisation möglich (Schnittfläche gelb). Wie aus Abb.17, Bild 3 ersichtlich, ist eine teilweise gemeinsame Lokalisation von Np9 und HtrA2ges darstellbar. Aufgrund der Tatsache, daß Np9 in subnukleären Strukturen lokalisiert ist, welche als Nukleoli des Zellkerns identifiziert wurden (Armbrüster et al., 2002) wirft dies die Frage nach einer gemeinsamen Lokalisation von HtrA2ges und Np9 in den Nukleoli des Zellkerns auf.

### 4.3 GST- Pulldown

Mit Hilfe des Glutathion-S-Transferase (GST)- Pulldown können Protein-Protein Interaktionen biochemisch durch Affinitätschromatographie nachgewiesen werden. Bei dieser Methode wird der Kopplungspartner P1 bakteriell als GST-Fusionsprotein des pGEX-Vektors exprimiert. Der potentielle Bindungspartner P2 wird durch *in-vitro* Translation durch ein gekoppeltes Transkriptions/Translations-System synthetisiert.

Experimentell ist aus ungeklärter Ursache lediglich die Synthese von Np9 als Bestandteil des Np9-GST Fusionsproteins möglich, so daß ausschließlich Np9 als Kopplungspartner an die Sepharosematrix zur Verfügung steht. Folglich wird die HtrA2 als potentieller Bindungspartner P2 eingesetzt. Durch Klonierung der HtrA2frag und HtrA2ges in den Expressionsvektor pSG5HA

bzw. pSG5 (vgl. Kap. 3.8) ist nach gezielter Induktion eine *in-vitro* Transkription/Translation möglich, im Rahmen derer der Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren vollzogen wird. Eine potentielle Bindung zwischen der HtrA2 und Np9 lässt sich in gegebenem Fall autoradiographisch durch Schwärzung auf einem Röntgenfilm darstellen.

#### 4.3.1. *In-vitro* Translation von HtrA2frag und HtrA2ges

Die *in-vitro* Translation der HtrA2frag und HtrA2ges erfolgt mit Hilfe des Konstrukts pSG5HA+HtrA2frag bzw. pSG5+HtrA2ges.

Im Rahmen dieses Translationsprozesses erfolgt die radioaktive Markierung der Proteine durch den Einbau der markierten Aminosäuren Methionin und Cystein, welche das Isotop  $^{35}\text{S}$  tragen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und Abgleich mit dem Referenzmarker erfolgt die Identifikation durch Autoradiographie.

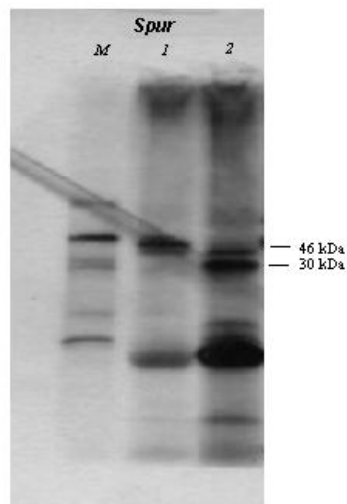


Abbildung 18: Autoradiographische Darstellung der HtrA2ges (Spur 1; 46kDa) und HtrA2frag (Spur 2; 30kDa) nach *in-vitro* Translation und radioaktiver Markierung mit  $^{35}\text{S}$ ; die Auftrennung erfolgt in einem 9,5-20% Gradientengel; dem Größenabgleich dient ein  $^{14}\text{C}$ - markierter Referenzmarker (M).



Nachweislich ist eine Expression der HtrA2ges und HtrA2frag durch *in-vitro* Translation möglich. Die Identifikation der HtrA2ges (ca. 46 kDa) und HtrA2frag (ca. 30 kDa) erfolgt durch Abgleich mit dem Referenzmarker. Folglich sind die experimentellen Voraussetzungen zur Durchführung eines GST-Pulldowns gegeben.

#### 4.3.2 GST- Pulldown Analyse

Zum Nachweis einer *in-vitro* Interaktion zwischen der HtrA2 (HtrA2frag und HtrA2ges) und Np9, wurde die HtrA2 in einem gekoppelten *in-vitro* Transkription-/ Translationssystem mit Hilfe des Vektors pSG5HA-HtrA2frag bzw. pSG5-HtrA2ges synthetisiert und durch Verwendung von <sup>35</sup>S- Methionin und <sup>35</sup>S Cystein radioaktiv markiert. Diese *in-vitro* Translatate wurden mit matrixgebundenem GST-Protein bzw. GST-Np9-Fusionsprotein und einem nativen Lysat aus eukaryotischen Zellen inkubiert, um die Bereitstellung bindungsrelevanter Faktoren zu gewährleisten. Die Auftrennung der matrixgebundenen Proteine erfolgt durch SDS-PAGE, die Darstellung der Protein-Interaktion durch Autoradiographie. Nachfolgend ist das Ergebnis eines GST-Pulldowns, der dem Nachweis einer potentiellen Bindung zwischen Np9 und HtrA2ges bzw. Np9 und Htr2frag dient, dargestellt (vgl. Abb. 19).

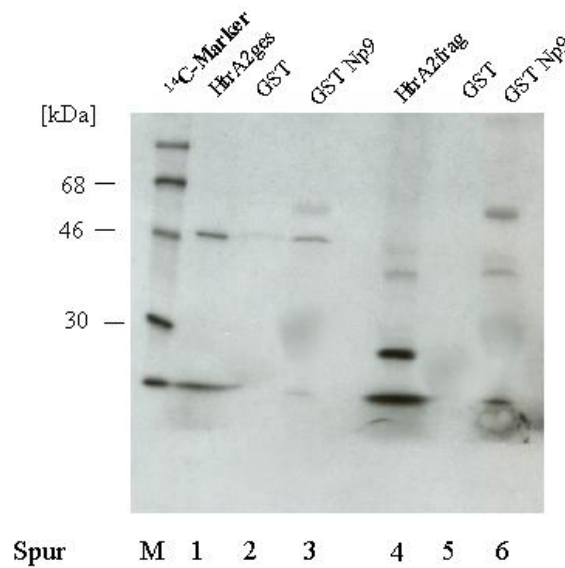


Abbildung 19: Autoradiographische Darstellung des GST-Pulldown zum Nachweis einer Bindung zwischen Np9 und HtrA2ges bzw. Np9 und HtrA2frag. *In-vitro* Translatate (Spur 1, 4) nach Inkubation mit matrixgekoppeltem GST-Protein (Spur 2, 5) und GST-Np9-Fusionsprotein (Spur 3, 6). Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE, die Darstellung durch Autoradiographie. Dem Größenabgleich dient ein  $^{14}\text{C}$ -markierter Referenzmarker (M).

Eine Bindung zwischen Np9 und HtrA2ges kann experimentell mit Hilfe des GST-Pulldown verifiziert werden (Spur 3). Eine Bindung zwischen Np9 und HtrA2frag kann hingegen experimentell nicht bestätigt werden (Spur 6).

Die Detektion der *in-vitro* Translatate gewährleistet eine experimentelle Absicherung und schließt die Möglichkeit einer nicht nachweisbaren Bindung auf Grund fehlender *in-vitro* Translation aus (Spur 1, 4) (Positivkontrolle). An matrixgebundenes GST-Protein erfolgt keine (Spur 2, 5) Bindung, so daß eine unspezifische Bindung zwischen GST und dem Bindungspartner P2 ausgeschlossen werden kann (Negativkontrolle).

## 5 Diskussion

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte ein transformationsförderndes Potential für *rec*, ein doppelt gespleißtes Produkt aus dem *env*-Leserahmen von HERV-K Typ2, nachgewiesen werden (Galli et al., 2005). Ein weiteres, doppelt gespleißtes Genprodukt aus dem gleichen Leserahmen eines HERV-K Typ1, welchem ebenfalls eine essentielle Bedeutung bei der Tumorgenese zugesprochen wird, ist *np9*. Die Expression von Np9 erfolgt ausschließlich in tumorös entartetem Gewebe und transformierten Zelllinien, nicht aber in normalen Zellen (Armbrüster et al., 2002). Der Nachweis einer Expression des Np9-Proteins konnte mittels spezifischer Antikörper in Tera-1 Zellen gegen Np9 erbracht werden (Armbrüster et al., 2004). Um die Rolle von Np9 im Rahmen der Tumorgenese besser verstehen zu können, ist es von essentieller Bedeutung, Interaktionspartner von Np9 zu identifizieren und deren Funktion auf zellulärer Ebene näher zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang wurden bereits mehrere Interaktionspartner von Np9 beschrieben. Dazu gehören LNX und PLZF, welche beide eine essentielle Funktion im Rahmen der Spermatogenese besitzen (Armbrüster et al., 2004; persönliche Mitteilung M. Denne) (vgl. Kap.1.14 und Kap.1.15).

Der im Hefe-II-Hybrid System identifizierte direkte Interaktionspartner LNX, eine E3 Ubiquitin Ligase, interagiert mit Numb, einem Protein, das in den Mechanismus der assymetrischen Zellteilung bei der Embryonalentwicklung involviert ist. Numb ist ein Antagonist zu dem Onkogen Notch-I, welches nachweislich eine Rolle in der Keimzelldifferenzierung spielt (McGill and McGlade, 2003). Basierend auf seinem onkogenen Potential, wird Notch-I eine essentielle Bedeutung in der Tumorgenese im Rahmen der Keimzelldifferenzierung zugesprochen.

Eine Interaktion konnte außerdem zwischen Np9 und dem Rec-Interaktionspartner PLZF nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung M. Denne). Rec ist ein 14 kDA großes akzessorisches Protein, dessen Expression in verschiedenen Keimzelltumorzelllinien durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnte (Lower et al., 1995). Das Protein Rec, früher als cORF (central open reading frame) bezeichnet, wird von einer doppelt

gespleißten mRNA abgelesen; beide Exons werden vom *env*- Leserahmen kodiert, besitzen jedoch ein unterschiedliches Leseraster (Lower et al., 1995). Vor allem die Arbeiten von Galli et al. bestätigen die vermutete Assoziation zwischen der Entwicklung von Keimzelltumoren und der Expression des *rec*-Gens von HERV-K(HML-2) (Galli et al., 2005). Rec besitzt vermutlich via PLZF ein transformationsförderndes Potential, das zur Ausbildung von Keimzelltumoren führen kann (Boese et al., 2002). Jüngste Publikationen belegen die Bedeutung von PLZF bei der Spermatogenese (Buaas et al., 2004; Costoya et al., 2004) sowie den regulatorischen Einfluß von PLZF auf das Onkogen c-myc (McConnel et al., 2003). Diese Tatsache bekräftigt die Bedeutung von Np9 für die Tumorgenese und unterstreicht die Korrelation der Np9-Expression in Keimzelltumoren.

Ferner konnte mit Hilfe des Hefe-II-Hybrid Systems die in dieser Arbeit beschriebene HtrA2 als ein Interaktionspartner von Np9 identifiziert werden (Armbrüster et al., 2004). Durch Abgleich in einer Gendatenbank (Accession Nr.: AF141305) wurde die Gensequenz mit 98%iger Homologie als der mittlere Teil der HtrA2-L Form identifiziert, der eine Länge von etwa 800 bp umfaßt.

In der Literatur wurden bislang 3 Mitglieder aus der Familie dieser humanen Serin- Proteasen (HumHtrA) identifiziert (Nie et al., 2003), welche sich in ihrer Struktur und damit zusammenhängend in ihrer Funktion zum Teil erheblich unterscheiden (vgl. Abb.6). Bislang wurden lediglich einem Mitglied (HtrA2) proapoptotische Eigenschaften zugesprochen. Im Rahmen der Streßantwort der Zelle wurde in diesem Fall eine Hochregulation der HtrA2 nachgewiesen, welche zu einer Steigerung der Apoptoserate führte (Nie et al., 2003). Möglicherweise lässt sich die Interaktion zwischen Np9 und HtrA2 auf die Ebene der Zellzykluskontrolle übertragen. Diese Hypothese muß gegebenenfalls durch weitere experimentelle Untersuchungen abgesichert werden.

## 5.1 Die Klonierung der HtrA2 (HtrA2ges)

Aufgrund der Tatsache, daß es sich bei dem im Hefe-II-Hybrid System identifizierten Klon um ein unvollständiges Gen handelt (HtrA2frag), dessen N- als auch C-terminale Sequenzen fehlen, war die Vervollständigung des Gens das primäre Ziel der Arbeit. Durch Abgleich mit einer Gendatenbank konnte dieser Teilklon als ein etwa 270 AS umfassender Teil der HtrA2 L-Form identifiziert werden, der N-terminale Anteile der RD-Domäne und die Trypsin-Domäne nahezu vollständig umfasst. Die Klonierung der gesamten HtrA2 (HtrA2ges) erfolgt mit Hilfe der PCR aus einer Testis cDNA-Bank. Eine Amplifikation der HtrA2ges in vollständiger Länge von ca. 1400 bp war experimentell jedoch nicht möglich. Die wiederholte Amplifikation unspezifischer Fragmente läßt eine unspezifische Bindung der Primer an die DNA-Matrize vermuten. Eine fehlende Amplifikation ließ sich sowohl durch Änderung der Annealing-Temperatur als auch der experimentell eingesetzten DNA-Konzentrationen nicht positiv beeinflussen. Aus diesem Grund wurde eine Teilklonierung der HtrA2ges durchgeführt, welche in Form des N-Terminus (HtrA2-N) mit ca. 200 bp, des mittleren Fragmentes (HtrA2-MI) mit ca. 480 bp und des C-Terminus (HtrA2-C) mit ca. 750 bp erfolgreich durchgeführt werden konnte. Die Ligation der Teilfragmente erfolgte sequentiell in den Vektor pUC18. Die korrekte Ligation wurde mit Hilfe eines Orientierungsverdaus überprüft; die Vollständigkeit des Gens konnte nach Klonierung und Sequenzierung der HtrA2ges in pGEM und Abgleich mit einer Gendatenbank bestätigt werden.

## 5.2 Das Zelllokalisations-Assay

Mit Hilfe des Lokalisations-Assays, durch welches die zelluläre Lokalisation der HtrA2 in einfach transfizierten und Np9 kotransfizierten Zellen *in-vivo* näher definiert werden kann, sollen Anhaltspunkte auf eine mögliche Interaktion beider Proteine erzielt werden. Hierzu wurden beide Proteine rekombinant als Fusionsproteine mit unterschiedlichen Fluorochromen in der

Zelle exprimiert und mittels Autofluoreszenz detektiert. Zur Verfügung gestellt wurden die Vektoren pEGFP-C1 und pDsRed-C1, welche zur Expression eines grün- bzw. rotfluoreszierenden Fusionsprotein eingesetzt werden.

Eine Klonierung der HtrA2 in den Vektor pDsRed-C1 führte zu einem nur schwach rot-fluoreszierenden Fusionsprotein. Aufgrund der daraus resultierenden mangelhaften Dokumentationsfähigkeit wurde für weitere experimentelle Zwecke die HtrA2 ausschließlich als rekombinantes grün-fluoreszierendes Fusionsprotein mit Hilfe des Vektors pEGFP-C1 exprimiert.

Die Klonierung des Teilfragmentes (HtrA2frag) und des Volllängenklons (HtrA2ges) in den Vektor pEGFP-C1 und anschließende Expression der grün-fluoreszierenden Fusionsproteine führten im Lokalisations-Assay zu unterschiedlichen Ergebnissen (vgl. Kap. 4.2.1 und 4.2.2). Während die HtrA2frag ausschließlich im Cytoplasma der Zelle in Form kleinkörniger Konglomerate lokalisiert ist, läßt sich die Lokalisation der HtrA2ges ausschließlich diffus verteilt im Zellkern nachweisen. Der Nachweis der Lokalisation der HtrA2 im Zellkern korreliert mit der von Gray et al. (2000) beschriebenen Lokalisation und würde die Vermutung einer potentiellen Bedeutung der HtrA2 am Abbau nukleärer Proteine bei zellulärem Stress bekräftigen.

Aufgrund der Tatsache, daß es sich bei HtrA2frag um das mittlere Fragment des Gesamtklons handelt, fehlen sowohl Teile der N- als auch die gesamte C-terminalen Sequenzen, wobei letztere für PDZ-Domänen kodieren (vgl. Abb.6). PDZ-Domänen (post synaptic density protein, disclarge, Zo-1-protein) sind häufig am Zusammenbau von membranassoziierten Signaltransduktionskomplexen und Ionenkanälen beteiligt und wirken als Adaptoren für zahlreiche multi-heteromere Proteinkomplexe (Borden et al. ,1998). Sie kodieren in der Regel für zwei  $\alpha$ -Helices und sechs  $\beta$ -Faltblattstrukturen mit einem hochkonservierten GLGF-Motiv am Übergang des  $\beta$ A und  $\beta$ B – Loops, (Hung & Sheng, 2002; Cowburn, 1997) welches für die Proteininteraktion verantwortlich gemacht wird. Möglicherweise ist das Fehlen der PDZ-Domäne im C-Terminus der HtrA2frag die Ursache für die Lokalisation der HtrA2frag im Cytoplasma der Zelle. Folglich sind N- bzw. C-terminale Sequenzen für eine Lokalisation der HtrA2 im Zellkern essentiell. Spezifische Domänen für Kernimportsignale (NLS) konnten durch

computergestützte Sequenzanalysen der HtrA2ges jedoch nicht identifiziert werden.

Hinweise auf eine Interaktion zwischen dem Volllängenklon HtrA2ges und Np9 können durch direkten Vergleich der zellulären Lokalisation der HtrA2ges in einfach mit Np9 kotransfizierten Zellen erzielt werden.

Die Lokalisation von Np9 liegt nachweislich in subnukleären Strukturen des Zellkerns, welche von Armbrüster et al. (2002) als Nukleoli der Zellkerne identifiziert wurden. Während die Lokalisation der HtrA2ges in einfach transfizierten Zellen diffus über den gesamten Zellkern erfolgt (vgl. Kap. 4.5.2), liegt die HtrA2ges in Np9 kotransfizierten Zellen in diskreten, subnukleären Strukturen im Zellkern vor (vgl. Kap. 4.2.3). Hinweise auf eine gemeinsame Lokalisation der HtrA2 und Np9 können mit Hilfe einer computertechnischen Bildüberlagerung erzielt werden, die eine Darstellung von Fluorochromen adäquater zellulärer Lokalisation ermöglicht, indem übereinanderliegende Signale als gelbe Bildbereiche dargestellt werden. Entsprechend den fluoreszenzmikroskopischen Ergebnissen (vgl. Kap. 4.2.3) ist eine teilweise gemeinsame Lokalisation von Np9 und HtrA2ges darstellbar. Aufgrund der Tatsache, daß Np9 nach Angaben von Armbrüster et al. (2002) in subnukleären Strukturen lokalisiert ist, welche als Nukleoli des Zellkerns charakterisiert wurden, existieren Hinweise, die für eine - zumindest partiell - gemeinsame Lokalisation von HtrA2ges mit Np9 in subnukleären Strukturen des Zellkerns sprechen. Bislang ist jedoch noch keine Funktion von Np9 beschrieben, die eine Assoziation mit den Nukleoli des Zellkerns erklären würde.

Im Rahmen der Koloalisationsstudien besitzen Aufnahmen mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM) eine höhere Aussagekraft gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie, da mit dieser Technik optische Schnitte durch eine Zelle gelegt werden können. Dadurch ist eine Beurteilung, ob Proteine übereinander, jedoch räumlich distanziert, oder tatsächlich in einer Ebene koloalisieren, eindeutig möglich.

Die Ergebnisse des Zelllokalisations-Assays bekräftigen jedoch die aus dem Hefe-II-Hybrid-System postulierte Interaktion zwischen Np9 und der HtrA2.

### 5.3 Die GST- Pulldown Analyse

Mit Hilfe des Glutathion-S-Transferase (GST)- Pulldowns kann biochemisch durch Affinitätschromatographie eine potentielle Bindung zwischen der HtrA2 (HtrA2ges und HtrA2frag) und Np9 nachgewiesen werden.

Theoretisch existieren für die experimentelle Durchführung folgende zwei Möglichkeiten, welche auch in praxi durchgeführt wurden :

Die Klonierung der HtrA2 in den pGEX-Expressionsvektor führt bei erfolgreicher bakterieller Expression zur Synthese des HtrA2-GST-Kopplungsproteins P1, welches die Bindung an die Sepharosematrix vermittelt. Die Klonierung der HtrA2 in das pSG5HA bzw. pSG5 Transkriptions/Translations- Vektorsystems führt hingegen zur *in-vitro* Synthese der HtrA2 als den potentiellen Bindungspartner P2. Da die Expression der HtrA2 in pGEX aus nicht bekannter Ursache nicht möglich war, wurde der bereits zur Verfügung stehende pGEX-Np9 Fusionsvektor zur Synthese des GST-Np9 Kopplungsproteins herangezogen. Die HtrA2 (sowohl HtrA2frag als auch HtrA2ges) wurde nach Klonierung in pSG5HA bzw. pSG5 und *in-vitro* Transkription/Translation als potentieller Bindungspartner eingesetzt. Im Rahmen dieses Translationsprozesses erfolgt eine Markierung des Proteins durch den Einbau der radioaktiven Aminosäuren Methionin und Cystein. Der Nachweis einer Bindung erfolgt gegebenenfalls autoradiographisch durch Schwärzung des Röntgenfilms als Bande charakteristischer Größe.

Wie die Ergebnisse in Kapitel 4.3.2. belegen, kann eine Bindung zwischen Np9 und HtrA2ges experimentell mit Hilfe des GST-Pulldowns nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu kann eine Bindung zwischen Np9 und HtrA2frag nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, daß im Falle der HtrA2 sowohl Teile der N-terminalen, als auch die gesamte C-terminale Proteindomäne fehlt, ist mindestens eine der beiden Proteindomänen für eine Bindung an Np9 essentiell.

Die Detektion der *in-vitro* Translatate gewährleistet eine experimentelle Absicherung, wodurch die Möglichkeit einer nicht nachweisbaren Bindung aufgrund fehlender *in- vitro* Translation ausgeschlossen werden kann. *In-vitro*



Translatate konnten sowohl für HtrA2frag (30 KDa) und HtrA2ges (46 KDa) nachgewiesen werden und wurden als solche über den Abgleich mit dem Referenzmarker identifiziert.

Neben dem Nachweis einer spezifischen Bindung zwischen der HtrA2ges und Np9 unter *in-vitro* Bedingungen mit Hilfe der GST-Pulldown-Analyse, steht der Nachweis einer Bindung beider Proteine unter *in-vivo* Bedingungen bislang noch aus. Eine sehr sensitive Möglichkeit, welche in diesem Zusammenhang in weiterführenden Experimenten eingesetzt werden kann, stellt das Ko-Immunpräzipitations-Assay dar.

Aufgrund der im GST-Pulldown erzielten Ergebnisse, kann die im Hefe-II-Hybrid System identifizierte HtrA2 als ein spezifischer Interaktionspartner von Np9 bestätigt werden. Der fehlende Nachweis einer spezifischen Bindung zwischen Np9 und der HtrA2frag läßt auf die Notwendigkeit der C- bzw. N-terminalen Proteindomänen für eine Bindung schließen. Die GST-Pulldown Ergebnisse korrelieren darüber hinaus mit den Befunden des Zelllokalisations-Assays. Erste Hinweise auf eine Interaktion zwischen der HtrA2ges und Np9 konnten bereits durch den Vergleich von HtrA2-einfach mit Np9-kotransfizierten Zellen erzielt werden. Die Kotransfektion der Cos-1 Zellen führte zu einer Änderung der Lokalisation von einer diffusen nukleären Verteilung im Falle der HtrA2-Transfektion zugunsten einer distinkten, subnukleären Lokalisation in HtrA2 und Np9 kotransfizierten Zellen, für welche eine teilweise übereinstimmende Lokalisation dargestellt werden konnte.

Zur Charakterisierung der Funktion dieser Assoziation zwischen Np9 und der HtrA2 sind weiterführende Experimente notwendig.

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit soll schwerpunktmäßig die Interaktion zwischen Np9 und der HtrA2 mit Hilfe eines Kolokalisations-Assays erhärtet werden, sowie eine spezifische Bindung beider Proteine durch eine GST-Pulldown-Analyse verifiziert werden.

Der im Hefe-II-Hybrid System gefundene Interaktionspartner von Np9 wurde als mittlerer Teil der HtrA2 L-Form (Accession Nr.: AF141305) identifiziert. Die Klonierung der gesamten HtrA2 (HtrA2ges) erfolgte aus drei Teilfragmenten (HtrA2-N, HtrA2-MI, HtrA2-C), welche sequentiell in den Vektor pUC18 ligiert und somit artifiziell zu dem Volllängenklon zusammengesetzt wurden.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß die HtrA2ges im Zellkern in Form einer diffusen Verteilung vorliegt. Ein Fehlen der N- und C-terminalen Domänen führt im Falle der HtrA2frag zu einer Lokalisation im Cytoplasma der Zelle in Form kleinkörniger Konglomerate. Die Gegenwart von Np9 in HtrA2ges kotransfizierten Zellen führt zu einer Translokation der HtrA2ges aus dem Zellkern in distinkte, subnukleäre Strukturen des Kerns. Durch digitale Bildbearbeitung ist eine teilweise übereinstimmende Lokalisation beider Proteine in subnukleären Strukturen darstellbar. Die Lokalisation von Np9 liegt nach Arbeiten von Armbrüster et al. in subnukleären Strukturen des Zellkerns, welche als Nukleoli des Zellkerns angesprochen wurden (2004).

Der Nachweis einer spezifischen Bindung zwischen Np9 und der HtrA2 wurde durch Affinitätschromatographie mit Hilfe des pGEX-Expressionssystems in Form einer GST-Pulldown Analyse verifiziert. Eine spezifische Bindung konnte zwischen HtrA2ges und Np9, nicht aber zwischen HtrA2frag und Np9 nachgewiesen werden.

Das Ergebnis des GST-Pulldown korreliert mit jenem des Zelllokalisations-Assays, welches bereits einen ersten Hinweis auf eine Interaktion zwischen HtrA2 und Np9 aufzeigte und verifiziert die im Hefe-II-Hybrid System identifizierte HtrA2 als einen spezifischen Interaktionspartner von Np9 .

## 7 Literaturverzeichnis

Akopov S. B., Nikolaev L. G., Khil P. P., Lebedev Y. B., and Sverdlov E. D. (1998). Long terminal repeats of human endogenous retrovirus K family (HERV-K) specifically bind host cell nuclear proteins. *FEBS Letters* 421:229-233.

Andersson , M.L., Lindeskog. M., Medstrand, P., Westley, B., May, F., and Blomberg, J. (1999). Diversity of human endogenous retrovirus class II-like sequences. *J Gen Virol* 80(Pt1), 255-60.

Antony,J.M., van Marle, G., Opii, W., Butterfield, D.A., Mallet, F., Yong, V.W., Wallace, J.L., Deacon, R.M., Warren K., Power, C.(2004). Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci* 7(10):1088-95

Armbruester, V., Sauter, M., Roemer, K., Best, B., Hahn, S., Nty A., Schmid, A., Philipp, S., Mueller, A., Mueller-Lantzsch, N., (2004). Np9 protein of human endogenous retrovirus K interacts with LNX (ligand of Numb proteinX). *J Virol* in press

Armbruester, V., Sauter, M., Krautkraemer, E., Meese, E., Kleiman, A., Roemer, K., Best, B., Mueller-Lantzsch, N., (2002). A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. *Clin Cancer Res* (6), 1800-7

Barbulescu, M., Turner, G., Seamann, M., Deinard, A. S., Kidd, K.K., Lenz, J. (1999). Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. *Curr Biol* 9 (16),861-8.

Barna, M., Hawe, N., Niswander, L., and Pandolfi, P.P. (2000). PLZF regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat. Genet.* 25, 166-172.

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouziox, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L., (1983). Isolation of a T-lymphotrophic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.

Bengtsson, A., Blomberg, J., Nived, O., Pipkorn, R., Toth, L., and Sturfeld, G. (1996). Selective antibody reactivity with peptides from human endogenous retroviruses and nonviral poly(amino acids) in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 39, 1654-1663.

Best S, Le Tissier P, Towers G, Stoye JP: Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene Fv1. *Nature* 1996, 382:826-829.

Bieche, I., Laurent A., Laurendeau, I., Duret, L., Giovangrandi, Y., Frendo, Y.L., Olivi, M., Fausser, J.L., Evain-Brion, D., and Vidaud, M. (2003). Placenta-specific INSL4 expression is mediated by a human endogenous retrovirus element. *Biol Reprod.* 6(4), 1422-9.

Blond JL, Beseme F, Duret L, Bouton O, Bedin F, Perron H, Mandrand B, Mallet F: Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol* 1999, 73:1175-1185.

Blond JL, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F, Cosset FL: An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol* 2000, **74**:3321-3329.

Boeke JD, Stoye JP: Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. *In Retroviruses*. Edited by: Coffin JM, Hughes SH,

Varmus HE. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997:343-435.

Boese, A., Sauter, M., Galli, U., Best, B., Herbst, H., Mayer, J., Kremmer, E., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N., (2000). Human endogenous retrovirus protein cORF supports cell transformation and associates with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Oncogene* 19 (38), 4328-36.

Boese, A., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N., (2000). A rev-like NES mediates cytoplasmatic localisation of HERV-K cORF. *FEBS Letter* 468 (1): 65-67.

Boese, A., Galli, U., Geyer, M., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N., (2001). The Rev/Rex homolog HERV-K cORF multimerizes via a C-terminal domain. *FEBS Lett.* 493(2-3):117-21.

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., and Boyer, H.W., (1977). Construction and characterisation of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2(2),95-113.

Boller, K., Konig, H., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N., Lower, R., Lower, J., and Kurth, R., (1993). Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology* 196(1),349-53.

Borden, K. L., Campbell Dwyer E. j., and Salvato M.S.. An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukaemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm. *J Virol.* 72(1):758-766,1998.

Brosius J: RNAs from all categories generate retrosequences that may be exapted as novel genes or regulatory elements. *Gene* 1999, 238:115-134.

Buaas, F.W., Kirsh, A.L., Sharma, M., McLean, D.J., Morris, J.L., Griswold, M.D., de Rooij, D.G., and Braun, R.E. (2004). Plzf is required in adult male

germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet* 36(6), 647-52

Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamidgels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112(2), 195-203.

Cabirac, G.F., Ries, D., Murray, R.S.,(1991). Multiple sclerosis human T-lymphotropic virus type I, and human endogenous retrovirus sequences. *Ann Neurol.* 29 (3), 343-4.

Callahan, R., Chiu, I.M., Wong, J.F., Tronick, S.R., Roe, B.A., Aaronson, S.A., Schlom, J. (1985). A new class of endogenous human retroviral genomes. *Science* 228: 1208-1211.

Callahan, R., Drohan, W., Tronick, S., and Schlom, J. (1982). Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 5503-5507.

Chaconas, G., and van de Sande, J.H., (1980). 5`32-Plabeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol* 65 (1),75-85.

Chen, NL., Bai, L, Deng, T., Zhang., C, Kong, QY., Chen, H. (2004). Expression of hepatitis B virus antigen and Helicobacter pylori infection in gastric mucosa of patients with chronic liver disease.Hepatobiliary Pancreat Dis Int 3(2):223-5

Clausen, T., Southan, C., and Ehrmann, M., (2002). The HtrA family of proteases. Implication for protein composition and cell fate. *Mol. Cell* 10, 443-455.

Costoya, J.A., Hobbs, R.M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig K.E., Wolgemuth, D.J., and Pandolci, P.P. (2004). Essential role of plzf in maintainance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* 36(6), 653-9.

Coffin, J.M., H., SH, Varmus HE (1997)."Retroviruses". Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Cohen M, Powers M, Oconnell C, Kato N: The nucleotide-sequence of the Env gene from the human provirus ERV3 and isolation and characterization of an ERV3-Specific cDNA. *Virology* 1985, 147:449-458.

Collingwood, T.N., Urnov, F.D., and Wolffe, A.P. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodelling in the control of transcription. *J. Mol. Endocrin.* 23,255-275.

Constancia, M., Hemberger, M., Hughes, J., Dean, W., Ferguson-Smith, A., Fundele, R., Steward, F., Kelsey, G., Fowden, A., Sibley, C., et al., (2002). Placental IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* (London) 417,945-948.

Conrad, B., Weissmahr, R.N., Boni, J., Arcari, R., Schupbach, J., and Match, B., (1997). A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* 90 (2),303-13.

Costas, J., (2001). Evolutionary dynamics of the human endogenous retrovirus family HERV-K inferred from full-length proviral genomes. *J Mol Evol* 53 (3),237-43.

Cowburn, D., (1997). Peptide recognition by PTB and PDZ domains. *Curr Opin Struct Biol* 7(6), 835-8.

de Parseval, N. and Heidmann, T. (1998). Physiological knockout of the envelope gene of the single-copy ERV-3 human endogenous retrovirus in a fraction of the Caucasian population. *J. Virol.* 72, 3442-3445.

Deveraux, Q.L. and Reed, J.C., (1999). IAP family proteins- suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 23, 239-252.

Dho, S. E., Jacob, S., Wolting, C.D., French, M. B., Rohrschneider, L. R., and Mc Glade, C. J., (1998). The mammalian numb phosphotyrosine-binding domain. Characterisation of binding specificity and identification of a novel PDZ-domain-containing numb binding protein, LNX. *J Biol Chem* 273(15), 9179-87.

Dinsmore, J.H., Manhart, C., Raineri, R., Jacoby, D.B., Moore, A. (2000). No evidence for infection of human cells with porcine endogenous retrovirus (PERV) after exposure to porcine fetal neuronal cells. *Transplantation* 15; 70(9):1382-1387.

Dirksen, G., Gründer, H-D., Stöber, M.: "Innere Medizin und Chirurgie" des Rindes, 4. Auflage (2002).

Dugaiczyk, A., Boyer H.W., and Goodman H.M., (1975). Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol* 96(1), 171-184.

Faccio, L., Fusco, C., Chen, A., Martinotti, S., Bonventre, J V., and Zervos, A. S., (2000). Characterisation of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J. Biol. Chem.* 275, 2581- 2588.

Fackler, O.T., Kremmer, E., and Mueller-Lantzsch, N. (1996). Evidence for the association of Nef protein with HIV-2 virions. *Virus Res.* 46, 105-110.

Fanning, A.S., and Anderson, J.M., (1996). Protein-protein interactions: PDZ domain networks. *Curr Biol* 6: 1385-1388.

Fields, BN., K. D., Howley, PM., (1996). „Virology“ 3 ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, New York.

Galli, U., Sauter, M., Lecher, B., Maurer, S., Herbst, H., Roemer, K., Mueller-Lantzsch, N. Human endogenous retrovirus Rec protein induces germ cell tumors in mice. *Oncogene*, 2005, *im Druck*.



Gaudin P, Ijaz S, Tuke PW, Marcel F, Paraz A, Seigneurin JM, Mandrand B, Perron H, Garson JA: Infrequency of detection of particle-associated MSRV/HERV-W RNA in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2000, 39:950-954.

Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23(1), 175-82.

Goff, S.P. (1996). Operating under a Gag order: a block against incoming virus by the Fv1 gene. *Cell* 86, 691-693.

Gotzinger, N., Sauter, M., Roemer K., and Mueller-Lantzsch, N. (1996). Regulation of human endogenous retrovirus-K Gag expression in teratocarcinoma cell lines and human tumours. *J Gen Virol* 77(Pt12),2983-90.

Graham, F.L., and van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52(2), 456-467.

Gray, C.W., Ward, R. V., Karran, E., Turconi, S., Rowles, A., Viglienghi ,D., Southan, C., Barton, A., Fantom, K.G., West A., et al., (2000). Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur.J.Biochem.* 267, 5699-5710.

Guenal, I., Mignatte, B. (1995). Studies of specific gene induction during apoptosis of cell lines conditionally immortalized by SV40 . *FEBS Letters*, 374 (3), 384-386.

Gyuris, J., Golemis,E., Chertkov, H., and Brent, R., (1993). Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75(4),791-803.

Hammerschmidt, W., Sugden, B. (2004). Epstein-Barr virus sustains Burkitt`s lymphomas and Hodgkin`s disease. *Trends Mol Med*,10(7):331-6.

Harris, B Z., and Lim, W.A., (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* 114 (Pt18), 3219-31.

Hata Y., Nakanishi H., and Takai Y., (1998). Synaptic PDZ domain- containing proteins. *Neurosci Res* 32(1),1-7.

Hawe, N., Soares, V., Niswander, L., Cattoretti, G., and Pandolfi PP (1996). Targeted disruption of the PLZF gene of acute promyelocytic leukaemia results in phocomelia and altered spermatogenesis. *Blood* 88, 291a.

Heimdal, K., Olsson, H., Tretli, S., Fossa, S. D., Borresen, AL., and Bishop, D.T., (1997). A segregation analysis of testicular cancer based on Norwegian and Swedish families. *Br J Cancer* 75 (7), 1084-7.

Herbst, H., Sauter, M., Kuhler-Obbarius, C., Loning, T., and Mueller-Lantzsch, N., (1998). Human endogenous retrovirus (HERV-K) transcripts in germ cell and trophoblastic tumors. *Ampis* 106 (1), 216-20.

Herbst, H., Sauter, M., and Mueller-Lantzsch, N., (1996). Expression of human endogenous retrovirus K elements in germ cell and trophoblastic tumors. *Am J Path* 149(5), 1727-35.

Hildinger,M., Dittmar, M.T., Schult-Dietrich, P., Fehse, B., Schnierle, B.S., Thaler, S., Stiegler, G., Welker, R., and von Laer, D. (2001). Membrane- anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry. *J. Virol* 75(6), 3038-42.

Hishikawa, T., Ogasawara, H., Kaneko, H., Shirasawa, T., Matsuura, Y., Sekigawa, I., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Hirose, S., Handa, S., Nagasawa, R., and Maruyama, N. (1997). Detection of antibodies to a recombinant gag protein derived from human endogenous retroviral clone 4-1 in autoimmune diseases. *Viral. Immunol.* 10,137-147.

Hohenadl, C., Germaier, H., Walchner, M., Hagenhofer, M., Herrmann, M., Sturzl, M., Kind, P., Hehlmann, R., Erfle, V., and Leib-Mösch, C. (1999). Transcriptional activation of endogenous retroviral sequences in human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. *J. Invest Dermatol.* 113, 587-594.

Holmes, D.S., and Quigley, M., (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114(1),193-197.

Hung, A.Y., and Sheng, M., (2002). PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* 277(8), 5699-702.

International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, 409:860-921

Jurka, J., (2000). Repbase update: a database and an electronic journal of repetitive elements. *Trends Genet* 16(9), 418-420.

York, D.F., Querat, G. (2003). A history of ovine pulmonary adenocarcinoma (jaagsiekte) and experiments leading to the deduction of the JSRV nucleotide sequence. *Curr Top Microbiol Immunol.* 275:1-23.

Karlsson H, Bachmann S, Schroder J, McArthur J, Torrey EF, Yolken RH: Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:4634-4639.

Karczewski, M.K. and Strebel, K. (1996). Cytoskeleton association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. *J. Virol.* 70, 494-507.

Kim, T.H., Jeon, Y.T., Yi, J.M., Kim, D.S., Huh, J.W., Hur, C.G., Kim, H.S. (2004). The distribution and expression of HERV families in the human genome. *Mol Cells.* 318(1):87-93.

Kirwan, J. M., Herold, J. J. O. (2002). Premalignant vulval disorders. *Current Obstetrics and Gynaecology* 12(2), 90-92.

Kitamura, Y., Ayukawa, T., Ishikawa, T., Kanda, T., and Yoshiike, K. (1996). Human endogenous retrovirus K10 encodes a functional integrase. *J. Virol* 70, 3302-3306.

Knöbl, M., Löwer, R., and Löwer, J. (1999). Expression of the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K is enhanced by cellular transcription factor YY1. *J. Virol.* 73, 1254-1261.

Krausslich, H.G., and Welker, R. (1996). Intracellular transport of retroviral capsid components. *Curr. Top. Mikrobiol. Immunol.* 214, 25-63.

Kushner (1997). „An improved method for transformation of Escherichia coli with coli-derived plasmids.“Genet Eng.( N.S. Boyer B, Ed) Elsevier, Amsterdam.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259), 680-685.

Lederberg, E.M. and Cohen S.N., (1974). Transformation of Salmonella Typhimurium by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 119(3), 1072-1074.

Le Tissier, P., J. P. Stoye, Y. Takeuchi, C. Patience, and R. A. Weiss. 1997. Two sets of human-tropic pig retroviruses. *Nature*. 389:681-682.

Levy, J. The Retroviridae. (3), 1994. Plenum Press, New York.

Zhang Li, Yu Ping, Li Shengfu, Bu Hong , Li Youping, Zeng Yangzhi , Cheng Jingqiu (2004). Phylogenetic relationship of porcine endogenous retrovirus (PERV) in Chinese pigs with some type C retroviruses. *Virus Research*,105(2):167-173.

Lindeskog, M., Mager, D.L., Blomberg, J. (1999): Isolation of a human endogenous retroviral HERV-H element with an open env reading frame. *Virology*, 258:441-450.

Lipinska, B., Fayet, O., Baird, L., and Georgopoulos, C., (1989). Identification, characterization, and mapping of the *E.coli* HtrA gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J Bacteriol* 171:1574-1584.

Lower, R., Boller, K., Hasenmayer, B., Korbmacher, C., Mueller-Lantzsch, N., Lower, J., and Kurth, R., (1993). Identification of human endogenous retrovirus with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (10), 4480-4.

Lower, R., Lower, J., Frank, H., Harzmann, R., and Kurth, R., (1984). Human teratocarcinomas cultered in vitro produce unique retrovirus-like viruses. *J Gen Virol* 65 (Pt5 ), 887-98.

Lower, R., Tonjes, R. R., Korbmacher, C., Kurth, R., and Lower, J., (1995). Identification of a Rev- related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K. *J Virol* 69(1),141-9.

Lower, R., Lower, J., Kurth, R. (1996): The viruses in all of us: Characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:5177-5184

Mager DL, Freeman JD (1987). Human endogenous retrovirus-like genome with type C pol sequences and gag sequences related to human T-cell lymphotropic viruses. *J Virol*; 61: 4060-4066

Magin C, Lower R, Lower J: cORF and RcRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K. *J Virol* 1999, 73:9496-9507.

Mangeney M, de Parseval N, Thomas G, Heidmann T (2001): The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties. *J Gen Virol*, 82:2515-2518

Maniatis, T. S. J., Fritsch E.F., (1998). Molecular cloning, a laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Martin, U., V. Kiessig, J. Blusch, A. Haverich, K. von der Helm, T. Herden, and G. Steinhoff (1998). Expression of pig endogenous retrovirus by primary endothelial cells and infection of human cells. *Lancet* 359:692-694.

Maury, W., Bradley, S., Wright, B., and Hines, R. (2000). Cell specificity of the transcription factor repertoire used by a lentivirus: motifs important for expression of equine infectious anemia virus in nonmonocytic cells. *Virology* 267, 267-278.

Mayer, J., Sauter, M., Racz, A., Scherer, D., Mueller-Lantzsch, N., and Meese, E. (1999). An almost intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7. *Nat Genet* 21(3), 257-8.

Mayer, J., Meese, E., and Mueller-Lantzsch, N., (1998). Human endogenous retrovirus K homologous sequences and their coding capacity in Old World Primates. *J Virol* 72(3),1870-5.

McGill, MA. and McGlade, CJ. (2003). Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *Biol Chem*. 278(25):23196-203.

Medstrand, P., and Blomberg, J. (1993). Characterisation of a novel reverse transcriptase encoding human endogenous retroviral sequences similar to type A and type B retroviruses: differential transcription in normal human tissues. *J. Virol*. 67, 6778-6787.

Meese, E., Gottert, E., Zang, K.D., Sauter, M., Schommer, S., and Mueller-Lantzsch, N. (1996). Human endogenous retroviral element K10 (HERV-K10): chromosomal localisation by somatic hybrid mapping and fluorescence in situ hybridisation. *Cytogenet. Cell Genet.* 72, 40-42.

Melnick, A. and Licht, J.D. (1999). Deconstructing a disease: RaRalpha, its fusion partners and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93,3167-3215.

Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Keith JC Jr, McCoy JM: Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 2000, 403:785-789.

Modrow, S., Falke, D., Truyen. "Molekulare Virologie", Spektrum Lehrbuch, 2. Auflage (2003).

Mueller-Lantzsch, N., Sauter, M., Weiskircher, A., Kramer, K., Best, B., Buck, M., and Grässer, F., (1993). Human endogenous retroviral element K10 (HERV-K10) encodes a full-length gag homologous 73-k Da protein and a functional protease. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9(4), 343-50.

Nie, G.Y., Li, Y., Minoura, H., Batten, L., Ooi, G.T., Findlay, J.K., and Salamonsen, L.A., (2003). A novel serin protease of the mammalian HtrA family is up-regulated in mouse uterus coinciding with placentation. *Mol Hum Reprod* 9(5), 279-90.

Nyberg, S.L., Hibbs, J.R., Hardin, J.A., Germer, J.J., Platt, J.R., Paya, C.V., and Wiesner, R.H. (2000). Influence of human fulminant hepatic failure sera on endogenous retroviral expression in pig hepatocytes. *Liver Transpl.* 6, 76-84.

Ono, M., Yasunaga, T., Miyata, T., and Ushikubo, H., (1986). Nukleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol* 60(2), 589-98.

Pallen, M.J. and Wren, B.W., (1997). The HtrA family of serine proteases. *Mol. Microbiol.* 26, 209-221.

Patience, C., Y. Takeuchi, and R. A. Weiss (1997). Infection of human cells by endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med.* 3:282-286.

Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, Ounanian-Paraz A, Camelo S, Dumon A, Jolivet-Reynaud C, Marcel F, Souillet Y, Borel E, Gebuhrer L, Santoro L, Marcel S, Seigneurin JM, Marche PN, Lafon M (2001): Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology*, 287:321-332.

Pulvertaft, J. V. (1965). A Study of Malignant Tumours in Nigeria by Short-Term Tissue Culture. *J Clin Pathol* 18, 261-273.

Rayevskaya, Galina B., Varshaver, Nina B, Shapiro, Nicolai I. (1989). Reversion to normal phenotype induced by SV40 in a spontaneously transformed malignant Chinese hamster cell line. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 37(1):39-47.

Reid, A., Gould, A., Brand, N., Cook, M., Strutt, P., Li, J., Licht, J., Waxman, S., Krumlauf, R., and Zelent A. (1995). Leukemia translocation gene, PLZF, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. *Blood* 86,4544-4552.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel S. Scharf S. J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Ehrlich H.A., (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839),487-491.



Sakalian, M., and Hunter, E. (1998). Molecular events in the assembly of retrovirus particles. *Adv. Exp. Med. Biol.* 440, 329-339.

Sauter, M., Roemer, K., Best, B., Afting, M., Schommer, S., Seitz, G., Hartmann, M., and Mueller-Lantzsch, N., (1996). Specificity of antibodies directed against Env-protein of human endogenous retroviruses in patients with germ cell tumors. *Cancer Res* 56 (19),4362-5.

Sauter, M., Schommer, S., Kremmer, E., Remberger, K., Dolken, G., Lemm, I., Buck, M., Best, B., Neumann-Haefelin, D., Mueller-Lantzsch, N., (1995). Human endogenous retrovirus K10:expression of Gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas. *J. Virol* 69(1), 414-21.

Schommer, S., Sauter, M., Krausslich, H.G., Best, B., and Mueller\_Lantzsch, N. (1996). Characterisation of the human endogenous retrovirus K proteinase *J. Gen. Virol* 77(Pt2):375-379.

Seifarth, W., Skladny, H., Krieg-Schneider, F., Reichart, A., Hehlmann, R., Leib-Mosch, C., (1995). Retrovirus-like particles released from the human breast cancer cell line T47-D display type B- and C-related endogenousretroviral sequences. *J Virol.* 69 (10), 6408-16

Sieburg, M., Tripp, A., Ma, JW., Feuer, G (2004). Human T-cell leukemia virus type1 (HTLV-1) and HTLV-2 tax oncoproteins modulate cell cycle progression and apoptosis.*J.Virol.*78(19):10399-409

Sgaramella,V., Van de Sande, J.H., and Khorana H.G:, (1970). Studies on polynucleotides, C.A novel joining reaction catalized by the T4-polynucleotide ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 67(3), 1468-75.

Stauffer Y, Marguerat S, Meylan F, Ucla C, Sutkowski N, Huber B, Pelet T, Conrad B: Interferon-alpha-induced endogenous superantigen. a model linking environment and autoimmunity. *Immunity* 2001, 15:591-601.

Studier, F.W., and Moffatt, B. A., (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189(1), 113-30.

Sugimoto, J., Matsuura, N., Kinjo, Y., Takasu, N., Oda, T., and Jinno, Y., (2001). Transcriptionally active HERV-K genes: Identification, isolation, and chromosomal mapping. *Genomics* 72(2), 137-44.

Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, Huber BT: Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity* 2001, 15:579-589.

Suzuki, J., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, H., Takio, K., and Takahashi, R., (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell* 8, 613-621.

Talal, N., Flescher, E., Dang, H., (1992). Evidence for possible retroviral involvement in autoimmune diseases. *Ann Allergy* 69 (3): 221-224

Temin HM. On the origin of RNA tumor viruses. *Harvey Lect* (1974); 69: 173-197.

Ting, C.N., Rosenberg, M.P., Snow, C.M., Samuelson, L.C., and Meisler, M.H. (1992). Endogenous retroviral sequences are acquired for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev.* 6, 1457-1465

Tonjes, R. R. (1997), Transplantation von Organen aus Schweinen - Gefahren durch endogene Retroviren. *Spektrum der Wissenschaft* 7, 15-21

Tonjes, R.R., Limbach, C., Lower, R., and Kurth, R., (1997). Expression of human endogenous retrovirus type K envelope glycoprotein in insect and mammalian cells. *J. Virol* 71(4), 2747-56.

Tonjes, R.R., Lower, R., Boller, K., Denner, J., Hasenmaier, B., Kirsch, H., König, H., Korbmayer, C., Limbach, C., Lugert, R., Phelps, R.C., Scherer, J., Thelen, K., Lower, J., and Kurth, R., (1996). HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13 Suppl 1, S. 261-7.

Tonjes, R.R., Czauderna, F., and Kurth, R. (1999). Genome-wide screening, cloning, chromosomal assignment and expression of full-length human endogenous retrovirus type K. *J. Virol* 73(11), 9187-95.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(9), 4350-54.

Turner, G., Barbulescu, M., Su, M., Jensen-Seaman, M.I., Kidd, K.K., and Lenz, J., (2001). Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol* 11(19), 1531-5.

Van der Laan, L. J. W., Lockey, C., Griffith, B. C., Frasier, F. S., Wilson, C. A., Onions, D. E., Hering, B. J., Long, Z., Otto, E., Torbett, B. E., Salomon, D. R. Letter, *Nature* 407:90-94, (2000).

Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P. G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., Moritz, R.L., Simpson, R. J., and Vaux, D.L., (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 277(1), 445-54.

Vogt, P.K., and Friis, R.R., (1971). An avian leukosis virus related to RSV(O): properties and evidence for helper activity. *Virology* 43(1), 223-34.

Welker, R., Kottler, H., Kalbitzer, H.R., and Krausslich, H.G. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology* 219, 228-236.

---

Wilson, C.A., Wong, S., Muller, J., Davidson, C.E., Rose, T.M., and Burd, P. (1998). Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J. Virol.* 72, 3082-3087.

Yang J, Bogerd HP, Peng S, Wiegand H, Truant R, Cullen BR: An ancient family of human endogenous retroviruses encodes a functional homolog of the HIV-1 Rev protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:13404-13408.

Yu, X., Yuan, X., Matsuda, Z., Lee, T.H., and Essex, M.(1992). The matrix protein of human immunodeficiency virustype 1 is acquired for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J. Virol.* 66 4466-4971.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.